



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)

BIOGÉNESIS DE LA MITOCONDRIA DURANTE EL CICLO CELULAR Y SUS ALTERACIONES EN CÁNCER

Memoria presentada por la licenciada
Marta Martínez Diez
para optar al grado de
Doctora en Biología Molecular
por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis: **Dr. José Manuel Cuezva Marcos**

Madrid, 2008

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Doctor José Manuel Cuezva Marcos, Catedrático del Departamento de Biología Molecular del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid (Octubre 2001-Septiembre 2005). Durante este periodo, la licenciada Marta Martínez Díez ha disfrutado de una Beca predoctoral del Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo (Octubre 2001-Julio 2002), asociada al proyecto de investigación 01/380 y de una Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Julio 2002-Septiembre 2005), asociada al proyecto de investigación BMC2001-0710.

José Manuel Cuezva Marcos, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular del
Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid,

INFORMA:

Que la doctoranda **D^a MARTA MARTÍNEZ DIEZ** ha realizado durante los últimos años bajo mi dirección, y en el Departamento de Biología Molecular, el trabajo original de investigación titulado **“Biogénesis de la mitocondria durante el ciclo celular y sus alteraciones en cáncer”** que presenta para optar al grado de Doctor en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid.

Los resultados obtenidos por Marta Martínez aportan nuevos datos de gran interés sobre la participación de la mitocondria en la biología del cáncer. Específicamente, ilustran que la expresión de la proteína de la función bioenergética de la mitocondria β -F₁-ATPasa está reprimida en carcinomas de esófago y ponen de manifiesto que la alteración de la expresión de proteínas del metabolismo energético proporciona una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico y la prognosis de pacientes con cáncer. En este sentido, se demuestra que la “huella bioenergética” tiene valor para la prognosis de pacientes con melanomas. Además, se ha profundizado en la caracterización de los mecanismos que pueden promover la alteración de la función bioenergética de la mitocondria en cáncer. Así, se ha estudiado el efecto que diferentes oncogenes tienen en el fenotipo metabólico de la célula habiendo observado, además, que la progresión tumoral *in vivo* selecciona células con alteraciones moleculares y funcionales de la mitocondria. Por otro lado, se caracteriza el mecanismo de participación de la actividad H⁺-ATP sintasa de la mitocondria en la ejecución de la muerte celular. Estos resultados aportan la base conceptual por la que se puede explicar la represión de la biogénesis mitocondrial en cáncer además de contribuir con un nuevo ejemplo que sustenta que el metabolismo energético y la ejecución de la muerte celular están molecular y funcionalmente integrados. En este trabajo Marta Martínez además aporta, por vez primera en el campo, una visión integrada de la biogénesis de la mitocondria durante la

proliferación celular. Estos datos son de un gran interés al ilustrar la relevancia de los mecanismos de control de la traducción para la correcta biogénesis de la mitocondria e identificar a la región 3'UTR del mRNA de β -F₁-ATPasa como la diana que regula la síntesis de la proteína en la fase G2/M del ciclo. Mediante el desarrollo de líneas celulares que expresan establemente gfp en la mitocondria también ha caracterizado la morfología y dinámica de la mitocondria durante la mitosis. Por último, y en contra de lo que se ha propuesto recientemente, los resultados de la tesis de Marta Martínez indican que la proteína β -F₁-ATPasa de la mitocondria no tiene una expresión ectópica en la membrana plasmática de la célula, lo que posiblemente ayude a clarificar las funciones biológicas que se han propuesto para esta proteína.

Quiero resaltar que estos resultados son pioneros en este campo de investigación y que han contribuido y contribuirán al desarrollo de nuevas vías de investigación relacionadas con el papel de la mitocondria en progresión tumoral y eventualmente haciendo de este orgánulo una diana terapéutica para atajar la enfermedad. Parte de los resultados obtenidos han sido ya objeto de publicación en cinco artículos científicos (*Biochem J* 378: 17-20 (2004), *J Biol Chem* 280: 13936-43 (2005), *Carcinogenesis* 27: 925-35 (2006), *PLoS ONE* 1: e107 (2006) y *J Clin Invest* 117: 719-29 (2007)) y de contribuciones a congresos nacionales e internacionales. Otros resultados serán objeto de publicación en el próximo futuro.

Por todo lo anterior, y dadas las aportaciones originales de este trabajo y la madurez científica que a mi juicio acredita D^a Marta Martínez Díez, considero que puede procederse a la presentación y defensa de esta Memoria.

Lo que hago constar a los efectos oportunos en Madrid, a 14 de diciembre de 2007



JOSE MANUEL QUEZVA MARCOS

A mis padres
A mis hermanos

La luna vino a la fragua
con su polisón de nardos.
El niño la mira, mira.
El niño la está mirando.

En el aire conmovido
mueve la luna sus brazos
y enseña, lúbrica y pura,
sus senos de duro estaño.

.....

Federico García Lorca

Lo más sospechoso de las soluciones es que se las
encuentra siempre que se quiere.

Rafael Sánchez Ferlosio

AGRADECIMIENTOS

Durante el tiempo en el que he desarrollado este trabajo he aprendido muchas cosas que me han ayudado a crecer científicamente y también de manera personal. Es difícil agradecer en tan poco espacio a las personas que me han ayudado, de una manera u otra, a conseguir esta meta.

En primer lugar me gustaría agradecer a José Manuel Cuezva (Pepe) la oportunidad que me dio de trabajar en su laboratorio para la realización de mi tesis doctoral. Gracias por todo lo que he aprendido bajo tu dirección.

A Laura Moya del Servicio de Dermatología y a Rosario Carrillo y Natalia Camarasa del Servicio de Anatomía patológica del Hospital Ramón y Cajal de Madrid por los datos clínicos y de seguimiento de los melanomas. A Angel Martínez Mistal del Servicio de Proceso de Imágenes de la Universidad de Oviedo por escribir el programa para la cuantificación inmunohistoquímica de los melanomas.

A los Servicios del CBM que han facilitado y contribuido en gran medida a esta tesis. Gracias a Juan y Valentina del Servicio de Cultivos, siempre dispuestos a ayudar. Gracias a los Servicios de Microscopía Electrónica, Citometría de flujo y Microscopía Confocal por ayudarnos a encontrar siempre la solución a nuestros problemas.

Gracias a todos los integrantes del laboratorio por facilitarme el trabajo ayudándome desinteresadamente siempre que lo he necesitado y sobre todo por ser mis amigos dentro y fuera. A Gema, por enseñarme tan pacientemente a investigar, y por ese entusiasmo contagioso que tengo la suerte de disfrutar todos los días. A Margarita, por todo, por alegrar día a día el laboratorio, por su ayuda incondicional, su apoyo, sus historias.... A Antonio, por hacerme reír hasta llorar. A Álvaro, por las discusiones científicas que tanto echo de menos. A María, por tirar siempre de mí y no dejarme caer. A Paloma, sin los inventos de la "PosDot" el laboratorio no es el mismo. A Sandra, por su sonrisa contagiosa y su enorme corazón.

Gracias a todos los compañeros del CBM, muy en especial a Mamen, a Enrique, a María Chorro, a los "Balbinos" y los del 450, por las conversaciones en los pasillos y en la sala de cultivos que tanto se agradecen y ayudan a eliminar tensiones. Por su interés en mis experimentos, sus consejos y ayudas.

Gracias a todos los amigos que he ganado en todo este tiempo y que me gustaría no perder el contacto una vez que vayamos acabando nuestras tesis. Recuerdo con nostalgia esas comidas en el CNB en las que reíamos y arreglábamos el mundo y que continuamos haciendo siempre que nos juntamos.

A Elise, la loca de Elise. Su alegría y constante sonrisa anima a uno incluso en los días peores. Gracias por estar siempre ahí.

A Quintana, un gran apoyo y amigo desde que en Burgos hicimos nuestras maletas para venir a estudiar Biología Molecular a Madrid.

A mis compañeros en Pharmamar por haberme aguantado en los momentos finales de estrés de la entrega de la tesis. Gracias por hacerme más agradable y fácil el trabajo.

Es difícil explicar lo que siento por mi pueblo, Bañuelos del Rudrón. Gracias a toda su gente, que aunque sea un pueblecito muy pequeño, está lleno de personas maravillosas, y necesitaría una tesis entera para agradecer uno a uno lo especial que te sientes allí. A las chicas, a los "The Others", a los "Perlas" y sin que sirva de precedente, a los "Mocos". Gracias a todos, por todos los momentos vividos y por preocuparos siempre de mis células.

De forma muy especial me gustaría agradecerle a mi "mono" tantas cosas.... su implicación en esta tesis, su infinita paciencia, sobre todo en mis momentos de crisis, sus ánimos, por hacerme reír y sobre todo por no permitir que olvidara que podía conseguirlo. Tu ternura y amor me hacen feliz.

No me gustaría olvidarme de Sixto y Agustina, mis abuelos. Gracias por vuestro amor y devoción. Os echo de menos. Gracias también a mi tío Ricardo y a mis primos, que son casi como mis hermanos, por su cariño y apoyo.

Pero sin duda, las personas más importantes y a quienes más tengo que agradecer son mis padres y mis hermanos. Sin ellos nunca lo hubiera conseguido. Gracias por todo lo que me habéis enseñado y lo que sigo aprendiendo. Gracias por vuestro apoyo y ánimo incondicional, por vuestro amor.

ABREVIATURAS

$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana de la mitocondria
Δp	Fuerza protón electromotriz
ΔpH	Gradiente químico de protones
4E-BPs	Proteínas de unión a 4E
Ab1	Anticuerpo monoclonal comercial contra β -F ₁ -ATPasa
Ab2	Anticuerpo policlonal generado contra la proteína recombinante β -F ₁ -ATPasa de hígado de rata
Ab3	Anticuerpo policlonal generado contra la subunidad β -F ₁ -ATPasa purificada de hígado de rata
Ab4	Anticuerpo monoclonal generado contra la proteína humana recombinante β -F ₁ -ATPasa
AMP/ADP/ATP	Adenina 5' mono/di/trifosfato
AMPK	Proteína quinasa dependiente de AMP
ApoA	Apolipoproteína A
ANT	Translocasa de nucleótidos de adenina
BEC	Índice bioenergético de la célula
BSA	Albúmina de suero bovino
CDKs	Quinasas dependientes de ciclina
CICD	Muerte celular independiente de caspasa
Ci	Curio
COX	Citocromo c oxidasa
CsA	Ciclosporina A
mtDNA	DNA mitocondrial
nDNA	DNA nuclear
DTT	Ditiotreitol
EBV	Virus Epstein-Bar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FDG	[¹⁸ F]-deoxi-2-fluoro-D-glucosa
FBS	Suero fetal bovino
eIF	Factor de iniciación eucariótico
FCCP	Carbonil-ciadina-p-trifluorometoxifenil hidrazona
GAPDH	Gliceraldehido-3-fofato deshidrogenasa
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1

HK	Hexoquinasa
IRES	Secuencia de iniciación interna de la traducción
MOMP	Permeabilización de la membrana externa de la mitocondria
MPT	Permeabilización transitoria de la mitocondria
NAD ⁺ /NADH	Nicotidamida-adenina dinucleótido oxidado/reducido
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDK-1	Piruvato deshidrogenasa quinasa 1
PET	Tomografía de emisión de positrones
PDTC	Pirrolidina ditiocarbamato
PMSF	Fenilmetil-sulfonilfluoruro
PK	Piruvato quinasa
PTP	Poro de permeabilización transitoria
mRNA	RNA mensajero
β -mRNA	RNA mensajero de la subunidad β -F ₁ -ATPasa
rRNA	RNA ribosómico
tRNA	RNA de transferencia
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Sodiododecilsulfato
S.E.M.	Error estándar de la media
SG	Supervivencia global
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
STS	Estaurosporina
UTR	Región no traducida
VDAC	Canal de aniones dependiente de voltaje

ÍNDICE

SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. LA MITOCONDRIA	7
1.1.1. Función bioenergética de la mitocondria	8
1.1.1.1. Estructura y función de la H ⁺ -ATP sintasa mitocondrial	10
1.1.1.2. Especies reactivas de oxígeno	11
1.1.2. Implicación de la mitocondria en muerte celular	12
1.1.2.1. El papel de la mitocondria en apoptosis	12
1.1.2.2. Permeabilización de la membrana mitocondrial	14
1.1.2.3. Muerte celular independiente de caspasas	15
1.1.3. Morfología y dinámica de la mitocondria	16
1.2. CÁNCER Y MITOCONDRIA	17
1.2.1. El ciclo celular	18
1.2.1.1. El control del ciclo celular	20
1.2.1.2. Traducción y ciclo celular	21
1.2.1.3. Metabolismo y ciclo celular	21
1.2.2. Implicación de la mitocondria en cáncer	22
1.2.2.1. Metabolismo energético de las células tumorales	23
1.2.2.2. Mutaciones del genoma mitocondrial y nuclear en cáncer	26
1.2.2.3. Evasión de apoptosis	27
1.2.2.4. Nueva terapéutica del cáncer	28
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. MATERIALES	37
3.1.1. Muestras humanas	37
3.1.1.1. Muestras de melanomas y características clínico-patológicas de los pacientes	37
3.1.1.2. Muestras de carcinomas de próstata y esófago	37
3.1.2. Líneas celulares	37
3.1.3. Animales de experimentación	37
3.1.4. Cepas bacterianas	38
3.1.5. Plásmidos usados en este trabajo	38
3.2. MÉTODOS	38
3.2.1. Obtención de líneas celulares estables	38
3.2.1.1. Transfección de plásmidos recombinantes en células en cultivo	38
3.2.1.2. Obtención de clones positivos	38
3.2.2. Sincronización celular	39

3.2.3. Extracción de proteínas	39
3.2.3.1. Extracción de proteína total a partir de biopsias de tejido humano	39
3.2.3.2. Fraccionamiento y obtención de extractos proteicos de hígado de rata	39
3.2.3.2.1. <i>Obtención de homogenizados post-nucleares</i>	39
3.2.3.2.2. <i>Aislamiento de mitocondrias mediante gradientes de sacarosa</i>	39
3.2.3.2.3. <i>Aislamiento de membranas plasmáticas mediante gradientes de sacarosa</i>	40
3.2.3.3. Extracción de proteína total a partir de cultivos celulares	40
3.2.4. Fraccionamiento electroforético de proteínas	40
3.2.4.1. <i>PAGE-SDS</i>	40
3.2.4.2. Electroforesis bidimensional	40
3.2.4.3. Tinción de las proteínas fraccionadas	41
3.2.4.4. Detección inmunológica de proteínas (<i>Western-blot</i>)	41
3.2.5. Tinción de proteínas y análisis mediante citometría de flujo	42
3.2.5.1. Tinción de proteínas de membrana	42
3.2.5.2. Tinción de proteínas intracitoplasmáticas	42
3.2.6. Estudio del contenido de gfp en el ciclo celular	42
3.2.7. Análisis de la expresión de proteínas en el ciclo celular mediante “sorting”	43
3.2.8. Aislamiento de RNA a partir de células en cultivo y análisis por <i>Northern blot</i>	43
3.2.9. Aislamiento de DNA a partir de células en cultivo y análisis por <i>Southern- blot</i>	44
3.2.10. Obtención de sondas marcadas radiactivamente de DNA	44
3.2.11. Técnicas de inmunomarcaje	45
3.2.11.1. Inmunofluorescencia	45
3.2.11.2. Inmunomicroscopía electrónica	46
3.2.11.2.1. <i>Criosustitución e inclusión en Lowicryl</i>	46
3.2.11.2.2. <i>Obtención de criosecciones ultrafinas</i>	46
3.2.11.2.3. <i>Inmunomarcaje</i>	46
3.2.11.3. Inmunohistoquímica	47
3.2.11.3.1. <i>Cuantificación de tinciones inmunohistoquímicas en melanoma</i>	47
3.2.11.3.1.1. Adquisición de imágenes	47
3.2.11.3.1.2. Procesamiento de Imágenes	47
3.2.12. Análisis del ciclo y muerte celular	48
3.2.13. Análisis de la actividad caspasa 3	49
3.2.14. Determinación de la producción de radicales libres de oxígeno	50
3.2.15. Determinación de la carbonilación de proteínas	50
3.2.16. Determinación del potencial de membrana mitocondrial	50
3.2.17. Determinación de la masa mitocondrial celular	51

3.2.18. Análisis “<i>in vivo</i>” de la dinámica mitocondrial	51
3.2.19. Determinación de la alcalinización de gránulos celulares	51
3.2.20. Medida del flujo glucolítico celular	52
3.2.21. Determinación de la respiración mitocondrial	52
3.2.22. Análisis estadístico	52
4. RESULTADOS	55
4.1. LA HUELLA BIOENERGÉTICA DEL CÁNCER	57
4.1.1. Carcinoma escamoso de esófago	57
4.1.2. Adenocarcinomas de próstata	58
4.1.3. Melanomas	58
4.2. ONCOGENES Y HUELLA BIOENERGÉTICA CELULAR	63
4.2.1. El oncogén PDGF	63
4.2.2. El oncogén PKB/AKT	65
4.2.3. El oncogén RAS	67
4.2.4. El oncogén EBV	69
4.3. EL PAPEL DE LA H⁺-ATP SINTASA EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER	71
4.3.1. La actividad de la H⁺-ATP sintasa es necesaria para una correcta ejecución de la apoptosis	71
4.3.2. Dinámica y morfología de la mitocondria en el proceso de muerte celular	73
4.3.3. La inhibición de la H⁺-ATP sintasa previene la salida de citocromo c de la mitocondria.	73
4.3.4. La actividad de la H⁺-ATP sintasa controla la producción de especies reactivas de oxígeno en respuesta a STS	76
4.4. BIOGÉNESIS Y DINÁMICA MITOCONDRIAL DURANTE EL CICLO CELULAR	78
4.4.1. Biogénesis y diferenciación de la mitocondria durante el ciclo celular	78
4.4.2. Control de la síntesis de β-F₁-ATPasa durante el ciclo celular	82
4.4.3. Morfología y dinámica mitocondrial durante la mitosis	86
4.5. LA SUBUNIDAD CATALÍTICA β-F₁-ATPasa DE LA H⁺-ATP SINTASA NO TIENE UNA EXPRESIÓN ECTÓPICA	89
4.5.1. Expresión no ectópica de β-F₁-ATPasa en hígado de mamíferos	90
4.5.2. Expresión no ectópica de β-F₁-ATPasa en endotelio y en células tumorales	93
5. DISCUSIÓN	97
5.1. Fenotipo metabólico del cáncer	99
5.2. Biogénesis y dinámica de la mitocondria durante el ciclo celular: papel del 3'UTR de β-F₁-ATPasa en la síntesis de la proteína	107
5.3. La H⁺-ATP sintasa no se encuentra localizada en la membrana plasmática	111

ÍNDICE

6. CONCLUSIONES	115
7. BIBLIOGRAFÍA	119
8. ANEXO 1	151
9. ANEXO 2	155

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Procesos moleculares que controlan la expresión de los genes implicados en la biogénesis mitocondrial	8
Figura 1.2. Fosforilación oxidativa y generación de radicales de oxígeno por la mitocondria	9
Figura 1.3. Estructura de la H ⁺ -ATP sintasa mitocondrial	10
Figura 1.4. Ejecución de muerte celular por apoptosis	13
Figura 1.5. El ciclo celular de mamíferos	19
Figura 1.6. Los marcadores del cáncer	23

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 3.1. Esquema del protocolo de sincronización	39
Figura 3.2. Cuantificación inmunohistoquímica de biopsias	48

RESULTADOS

Figura 4.1. Análisis mediante Western-blot y cuantificación de los niveles de expresión de marcadores mitocondriales y glucolíticos en carcinomas escamosos de esófago y adenocarcinomas de próstata	58
Figura 4.2. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de los marcadores mitocondriales y glucolíticos en biopsias de melanoma	59
Figura 4.3. Curvas de supervivencia de las características clínico-patológicas de la población de melanomas de estudio	60
Figura 4.4. Expresión de los marcadores mitocondriales y glucolíticos en biopsias de melanomas (Mel.) y metástasis (Met.)	61
Figura 4.5. Curva de supervivencia para la razón β -F ₁ -ATPasa/GAPDH	62
Figura 4.6. Análisis de los niveles de expresión de marcadores mitocondriales y glucolíticos y del flujo glucolítico en células SV7tert, SV7tertPDGF y de las dos líneas tumorales derivadas de esta última tras su implantación en ratones nude	64
Figura 4.7. El factor de crecimiento PDGFBB favorece el potencial bioenergético de la mitocondria	61
Figura 4.8. La expresión constitutiva de Akt activa induce glucólisis en células WM35	66
Figura 4.9. La inducción del metabolismo glucolítico por Akt es independiente de AMPK	66
Figura 4.10. Análisis bidimensional de β -F ₁ -ATPasa en células WM35 y WM35PKB	67
Figura 4.11. El oncogén Ras aumenta el fenotipo bioenergético de la mitocondria en células L10BIOBR	68
Figura 4.12. La progresión del tumor está ligada a un cambio en el potencial bioenergético de la mitocondria	70
Figura 4.13. La oligomicina y la aurovertina A retrasan la muerte celular inducida por estaurosporina	72

Figura 4.14. La inhibición de otras ATPasas celulares intensifica la muerte celular inducida por estaurosporina	72
Figura 4.15. Cambios en la morfología mitocondrial después del tratamiento con estaurosporina	73
Figura 4.16. La estaurosporina promueve una hiperpolarización del $\Delta\psi_m$	74
Figura 4.17. La oligomicina retrasa la salida de citocromo c promovida por estaurosporina	75
Figura 4.18. La inhibición de MTP no previene ni la salida de citocromo c ni la muerte celular	75
Figura 4.19. El $\Delta\psi_m$ controla la producción de especies reactivas de oxígeno	76
Figura 4.20. La neutralización de radicales de oxígeno previene la muerte celular inducida por estaurosporina	77
Figura 4.21. Análisis de la sincronización de células C9	78
Figura 4.22. Síntesis de constituyentes de la mitocondria durante el ciclo celular	79
Figura 4.23. Acumulación de proteínas mitocondriales durante el ciclo celular	80
Figura 4.24. Síntesis preferencial de β -F ₁ -ATPasa y Hsp60 en fase M del ciclo celular	81
Figura 4.25. Biogénesis y diferenciación mitocondrial en el ciclo celular	82
Figura 4.26. El mRNA de β -F ₁ -ATPasa no presenta cambios en su expresión durante el ciclo celular	83
Figura 4.27. Síntesis preferencial de gfp en fase M del ciclo celular	84
Figura 4.28. Generación de una línea celular estable con la región 3'UTR del mRNA del factor de transcripción mitocondrial Tfam	85
Figura 4.29. La región 3'UTR del mRNA de β -F ₁ -ATPasa controla la expresión diferencial de gfp en el ciclo celular	85
Figura 4.30. La presecuencia de β -F ₁ -ATPasa dirige gfp a las mitocondrias	86
Figura 4.31. Morfología y dinámica de la mitocondria durante el ciclo celular	88
Figura 4.32. Dinámica mitocondrial durante el ciclo celular	89
Figura 4.33. Estudio de la expresión de β -F ₁ -ATPasa en hígado mediante técnicas de inmunomarcaje	90
Figura 4.34. Estudio de la expresión de β -F ₁ -ATPasa en células HepG2 mediante inmunofluorescencia	91
Figura 4.35. Estudio de la expresión de β -F ₁ -ATPasa en células HepG2 mediante citometría de flujo	92
Figura 4.36. Análisis de la expresión de β -F ₁ -ATPasa en distintos compartimentos celulares obtenidos mediante fraccionamiento subcelular de hígado de rata	93
Figura 4.37. La presecuencia de β -F ₁ -ATPasa dirige la proteína exclusivamente a la mitocondria	93
Figura 4.38. Estudio de la expresión de β -F ₁ -ATPasa en células endoteliales mediante microscopía electrónica	94
Figura 4.39. Expresión de β -F ₁ -ATPasa en células HMEC-1	95
DISCUSIÓN	
Figura 5.1. El efecto Warburg en cáncer	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Expresión de marcadores de la huella bioenergética en biopsias de piel (nevus y melanomas) y en biopsias de metástasis	153
Tabla 4.2. Regresión de Cox de las características clínico-patológicas de la población de estudio	153
Tabla 4.3. Características clínico-patológicas y niveles de expresión de los marcadores metabólicos en biopsias de melanoma	154
Tabla 4.4. Características clínico-patológicas y niveles de expresión de los marcadores mitocondriales en los grupos A y B de biopsias de melanoma	63



SUMMARY

Mitochondria play essential roles in cellular energetic metabolism, the execution of cell death and intracellular calcium and reactive oxygen species signalling. A growing number of human diseases are nowadays associated with the molecular and/or functional alteration of mitochondria. The results reported in this thesis emphasize the role of the mitochondria in cancer biology. In this regard, Otto Warburg reported, as early as in 1924, that the glycolytic phenotype of tumors results from mitochondrial malfunction in the cancer cell. However, his hypothesis has been basically neglected until recently. Herein, we have studied in normal and tumor biopsies derived from the same patients the changes in the expression level of bioenergetic and structural mitochondrial proteins concurrently with the expression of glycolytic markers of the cell, the so-called “bioenergetic signature”. In agreement with previous findings in other carcinomas, the results obtained in squamous carcinomas of the oesophagus support the original Warburg hypothesis because we observed a reduction of the bioenergetic competence of the organelle when compared to normal oesophageal tissue. In contrast, in prostate adenocarcinomas we observed no alterations of the bioenergetic signature what might suggest that carcinogenesis affects the phenotype of mitochondria in a tissue-specific manner. The finding of an alteration in the metabolic proteome of cancer as a common feature of most type of carcinomas led us to consider the “bioenergetic signature” as a tool for the diagnosis and prognosis of cancer patients. Indeed, the use of these markers of metabolism allowed the molecular discrimination of melanomas from its metastasis as well as a group of melanoma patients with worse prognosis. Furthermore, the β -F₁/GAPDH ratio provided a significant marker of disease progression for melanoma patients.

From the mechanistic point of view, we have studied the effect of oncogenes (RAS, PDGF, AKT and EBV) on the “bioenergetic signature” and rates of cellular glycolysis. We find a variable effect of the different oncogenes in the energetic metabolism of the cell illustrating that tumor progression is linked to changes in the bioenergetic phenotype obtaining that tumor progression selects apparently cells with a higher glycolytic metabolism.

Since it appears that alterations in mitochondrial physiology contribute to the Warburg effect, a question arises: which is the advantage and mechanistic contribution of the downregulation of oxidative phosphorylation for the cancer cell? In this regard, we show that the activity of the H⁺-ATP synthase participates in the execution of cell death by controlling the generation of reactive oxygen species which in turn promote a severe oxidative damage to mitochondrial proteins, favouring in this way the release of apoptogenic molecules from the organelle. These results provide an additional evidence linking metabolism to cell death and support strongly that the acquisition of a Warburg phenotype is another strategy of cancer cells in order ensure its perpetuation.

Our knowledge of the basic cell biology and on the timing and mechanism that control the biosynthesis of mitochondrial constituents during progression through the cell cycle of

SUMMARY

mammalian cells remain largely unknown. In this work we document the timing of the biosynthesis of different mitochondrial constituents during progression through the cell cycle and illustrate the relevance of the control of translation for appropriate biogenesis of mitochondria. In this regard, we show that the 3'UTR of β -mRNA controls the synthesis of the protein at G₂/M, a stage when full development of the mitochondrial membrane potential is attained. Moreover, we document the dynamics and morphological changes experimented by mitochondria during mitosis.

A long-standing dogma of cellular and evolutionary biology has been that H⁺-ATP synthases of F-type are exclusively present in the inner membrane of mitochondria of cell of mammals. However, recent reports claim that this complex is localised at the plasma membrane of human hepatocytes and tumor and endothelial cells. Here we show, using four different antibodies raised against the β -chain of the mitochondrial H⁺-ATP synthase, and various immunolocalitation techniques and subcellular fractionation experiments, that there is no molecular evidence that could support an ectopic expression of the β -chain on the cell-surface of these cells.

INTRODUCCIÓN

1.1. LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias son orgánulos de doble membrana con morfología y funciones específicas que contienen en su interior su propio genoma y sistema de transcripción-traducción (Attardi y Schatz, 1988; Kelly y Scarpulla, 2004). La mitocondria juega un papel fundamental en la homeostasis de la célula eucariota ya que alberga la maquinaria molecular requerida para la provisión de energía. La producción de energía se lleva a cabo mediante la oxidación de sustratos en un proceso acoplado a la fosforilación oxidativa en el que el ADP celular se fosforila dando lugar a ATP. Además, la mitocondria está implicada en otros procesos adicionales tales como la síntesis de esteroides y lípidos, la descarboxilación oxidativa del piruvato, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la oxidación de ácidos grasos. Ciertas enzimas del ciclo de la urea y de la gluconeogénesis están localizadas en la matriz mitocondrial. La mitocondria está también involucrada en la regeneración de NAD⁺ y en la homeostasis intracelular de iones como el calcio y el fosfato. En los últimos años, la mitocondria ha sido el objeto central de numerosos estudios debido a su papel como sensor y ejecutor de la apoptosis (Green y Reed, 1998; Ravagnan y cols., 2002). Por todo ello, no es de extrañar, que alteraciones en este orgánulo estén involucradas en el desarrollo de un gran número de patologías con manifestaciones fenotípicas muy diferentes (Wallace, 2005b).

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que responden al entorno y a señales de desarrollo de acuerdo con la demanda de energía celular. Debido a que las necesidades de energía de la célula varían, el contenido de mitocondrias es variable y puede ser ajustado de acuerdo a la nueva situación (Hood, 2001; Lowell y Spiegelman, 2000). La biogénesis mitocondrial tiene lugar como resultado de dos programas con regulación muy diferente, proliferación y diferenciación mitocondrial (Cuezva y cols., 1997). La proliferación mitocondrial implica un aumento relativo del número de mitocondrias por célula (Cuezva y cols., 1997). La diferenciación es un proceso puntual en el que se promueven cambios estructurales, moleculares y funcionales en las mitocondrias de tal manera que mitocondrias ineficientes en la conversión de la energía se convierten en orgánulos plenamente funcionales (Valcarce y cols., 1988; Cuezva y cols., 1997). En conjunto, ambos programas dan cuenta del incremento del número de mitocondrias por célula y del acoplamiento bioenergético de las mismas.

La biogénesis de la mitocondria requiere la expresión de aproximadamente 1000 genes que están codificados en el genoma nuclear y el genoma mitocondrial. La gran mayoría de estos genes están codificados en el genoma nuclear y la regulación de su expresión parece estar controlada mayoritariamente por mecanismos transcripcionales (Scarpulla, 2006) (Figura 1.1). El DNA mitocondrial (mtDNA) es una molécula circular de doble banda y codifica para 13 polipéptidos involucrados en fosforilación oxidativa, 2 rRNAs (12S y 16S) y 22 tRNAs que son esenciales para la síntesis de proteínas en la mitocondria (Attardi y Schatz, 1988; Fernandez-Silva y cols., 2003).

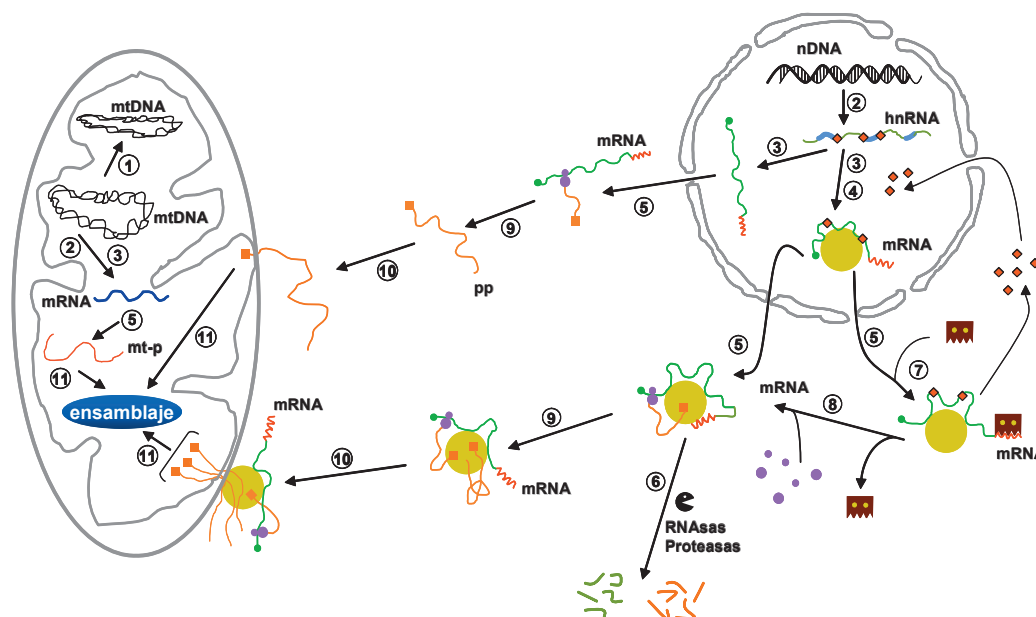


Figura 1.1. **Procesos moleculares que controlan la expresión de los genes implicados en la biogénesis mitocondrial.** 1) Replicación del DNA mitocondrial. 2) Transcripción de los genes nucleares (nDNA) y mitocondriales (mtDNA). 3) Procesamiento y maduración de los transcritos primarios (hnRNA en el núcleo). 4) En el caso de algunos mRNAs nucleares (β -F₁-ATPasa) el mRNA es ensamblado en una estructura compleja en el núcleo del hepatocito con anterioridad a su salida al citoplasma. Otros mRNAs nucleares (α -F₁-ATPasa) son exportados sin un ensamblaje aparente en estructuras definidas involucradas en la localización del mRNA. 5) El mRNA, una vez maduro, y siempre unido a proteínas formando complejos ribonucleoproteicos (mRNPs), se exporta al citoplasma en un proceso altamente regulado. Ya en el citoplasma, los mRNAs se traducen con mayor o menor eficiencia y 6) se degradan con mayor o menor rapidez en unos procesos complejos y muy regulados en los que intervienen distintos factores en *cis* y en *trans*. 7) En el caso de ciertos mRNAs codificados en el núcleo (β -F₁-ATPasa) la ribonucleoproteína exportada puede sufrir un proceso de enmascaramiento traduccional (una represión traduccional) mediada por la unión de proteínas reguladoras al 3'UTR del mRNA. Este proceso de enmascaramiento puede influir también en la estabilidad del transcrito. 8) Como resultado de la acción de determinadas señales, el enmascaramiento del mRNA puede cesar debido a la pérdida de la actividad de unión de los factores que se unen al mRNA. 9) Se completa la síntesis de precursores proteicos mitocondriales (pp), tanto deslocalizados (α -F₁-ATPasa) como localizados (β -F₁-ATPasa). 10) Los precursores proteicos que se sintetizan deslocalizados pueden ser importados a la mitocondria con la ayuda de las proteínas involucradas en el proceso de importación mediante difusión aleatoria por la membrana. Por el contrario, los precursores proteicos sintetizados en estructuras localizadas pueden migrar unidas a la ribonucleopartícula a través del citoesqueleto hasta la mitocondria. Los chaperones moleculares colaboran en la traducción y direccionamiento de los precursores proteicos tanto localizados como deslocalizados 11) Las proteínas recién importadas son dirigidas y, a veces, ensambladas con las proteínas sintetizadas por la propia mitocondria. (Imagen adaptada de Cuezva y cols., 1997)

1.1.1. Función bioenergética de la mitocondria.

La fosforilación oxidativa mitocondrial engloba los complejos respiratorios de la cadena de transporte de electrones (I-IV) más el complejo V, la H⁺-ATP-sintasa. Los complejos de la cadena respiratoria están localizados en la membrana interna de la mitocondria y transportan los equivalentes reducidos que provienen de la oxidación de sustratos metabólicos hasta la molécula de oxígeno (O₂), el último aceptor de electrones (Figura 1.2). La energía generada por el transporte de electrones se utiliza para producir ATP. De esta forma, los electrones provenientes de la oxidación de carbohidratos y grasas

son transferidos al complejo I (NADH deshidrogenasa) vía la coenzima NADH (forma reducida) o al complejo II (succinato deshidrogenasa) desde el succinato vía FADH_2 (forma reducida) y son finalmente aceptados por O_2 generándose una molécula de H_2O . Mientras los electrones fluyen por la cadena de transporte de electrones los complejos respiratorios I, III y IV bombean protones desde la matriz a través de la membrana interna mitocondrial (Figura 1.2). Esto genera un gradiente electroquímico ($\Delta\mu\text{H}^+ = \Delta\psi + Z\Delta\text{pH}$) que es positivo y ácido en el exterior y negativo y básico en el interior de la matriz. Este gradiente electroquímico es el intermediario para la síntesis de ATP (Boyer, 1997; Capaldi y Aggeler, 2002). El establecimiento de tal intermediario requiere que la membrana interna de la mitocondria posea una baja conductancia, es decir, una gran resistencia al movimiento de protones. La reentrada de protones al interior a través del canal de protones del complejo V (H^+ -ATP sintasa) promueve cambios conformacionales en el complejo F_1 con resultado de la síntesis de ATP desde ADP y fosfato inorgánico (Boyer, 1997; Capaldi y Aggeler, 2002) (Figura 1.2). El ATP así generado se exporta al citosol desde la matriz mediante la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT-*Adenine Nucleotide Translocase*).

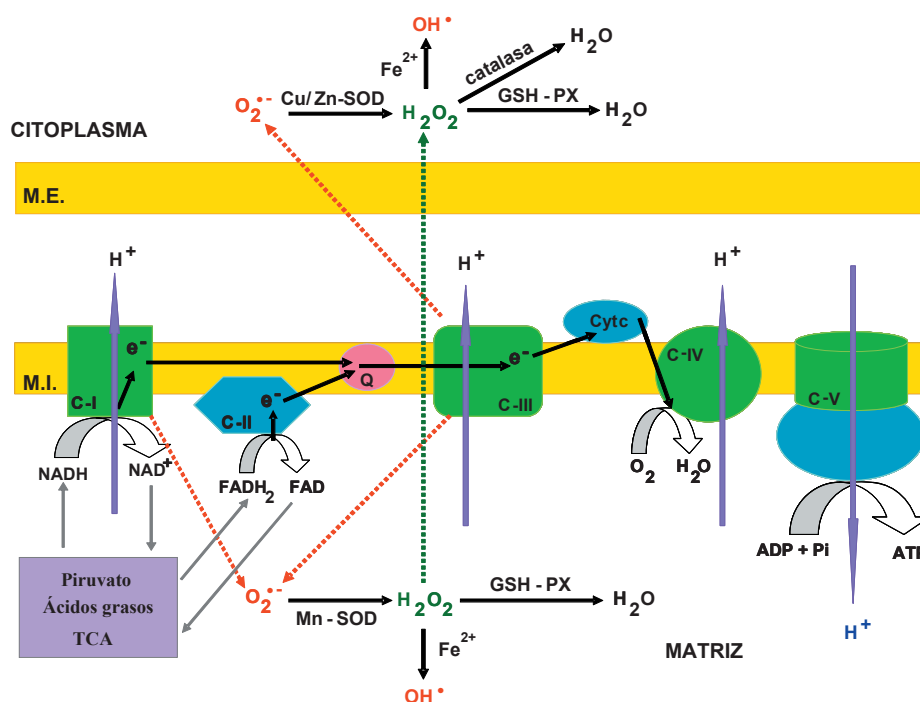


Figura 1.2. **Fosforilación oxidativa y generación de radicales de oxígeno por la mitocondria.** La oxidación de sustratos metabólicos produce la reducción de las coenzimas NAD^+ y FAD que alimentan de electrones (e^-) a los complejos de la cadena respiratoria que se encuentran en la membrana interna de la mitocondria (M.I.). El último aceptor de e^- es la molécula de oxígeno y se genera una molécula de agua. La transferencia de e^- está acoplada a un bombeo de protones desde la matriz al espacio intermembrana por los complejos C-I, C-III y C-IV que genera un gradiente electroquímico a través de la membrana interna. El gradiente electroquímico es la fuerza que utiliza la H^+ -ATP sintasa (C-V) para generar ATP. Sin embargo, el C-I y el C-III pueden donar directamente electrones al oxígeno molecular para generar el radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). El radical tóxico es transformado a agua oxigenada por la acción de las enzimas superóxido dismutasa citosólica y mitocondrial (SOD). Enzimas glutatión peroxidasa (GSH-PX) son las responsables de reducir el agua oxigenada a agua. El agua oxigenada puede reaccionar con metales de transición reducidos (Fe^{2+}) para generar el radical hidroxilo (OH^\bullet). Q, ubiquinona; Cyt c, citocromo c; M.E., membrana externa.

1.1.1.1. Estructura y función de la H^+ -ATP sintasa mitocondrial.

La enzima responsable de la generación de la mayor cantidad de ATP es la H^+ -ATP sintasa (F_0F_1 ATPasa). Este complejo multiproteico se ha encontrado en la membrana plasmática de bacterias, en la membrana tilacoidal del cloroplasto de plantas y en la membrana interna mitocondrial de levaduras, plantas y animales. Recientemente, se ha descrito la presencia de F_0F_1 ATPasa en la membrana plasmática de células endoteliales humanas (Moser y cols., 1999) y de hepatocitos (Martinez y cols., 2003). En estos casos se ha sugerido que la F_0F_1 ATPasa funciona como receptor de angiotatina (Moser y cols., 1999) y de apolipoproteína A (ApoA) (Martinez y cols., 2003), respectivamente.

El complejo puede ser dividido en dos subcomplejos funcionalmente distintos (Figura 1.3). Uno hidrosoluble denominado F_1 que se encuentra expuesto a la matriz mitocondrial (Boyer, 1997; Karrasch y Walker, 1999) y que posee la actividad catalítica del complejo, y un subcomplejo liposoluble F_0 que se encuentra embebido en la membrana interna mitocondrial y que actúa como canal de protones (Lutter y cols., 1993; Karrasch y Walker, 1999). El subcomplejo F_0 es un motor giratorio y está unido a F_1 por dos tallos que hace que la rotación esté directamente acoplada. La orientación de ambos subcomplejos es tal que ellos tienden a girar en direcciones opuestas (Yoshida y cols., 2001; Capaldi y Aggeler, 2002). En condiciones fisiológicas, el transporte de protones a través del canal F_0 hace que su fuerza rotatoria sea mayor por lo que F_1 gira en sentido opuesto. Esto origina cambios conformacionales en el subcomplejo F_1 que conducen a la síntesis de ATP dirigida por el gradiente electroquímico ($\Delta\mu H^+$) (Capaldi y Aggeler, 2002).

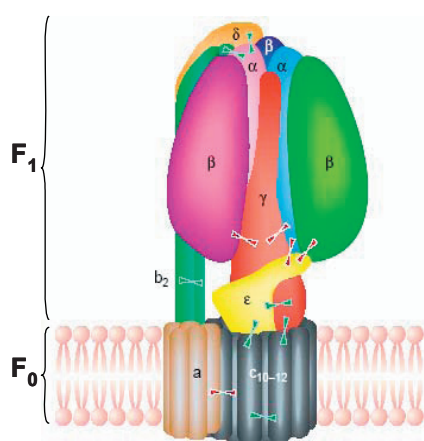


Figura 1.3. **Estructura de la H^+ -ATP sintasa mitocondrial.** Disposición de las subunidades de la H^+ -ATP sintasa. Una de las subunidades α ha sido eliminada del subcomplejo F_1 para revelar la subunidad γ dentro de las subunidades $\alpha_3\beta_3$. Hay tres subunidades $\alpha\beta$, mostradas en rojo, verde y azul (β en oscuro y α en claro). El dominio $\alpha_3\beta_3$ está unido a la subunidad a del subcomplejo F_0 por un tallo periférico compuesto por la subunidades δ y dos subunidades b . El anillo formado por la subunidad c de F_0 está unido a las subunidades γ y ϵ y forman el eje central del rotor. El complejo enzimático sólo es capaz de sintetizar ATP a partir de la traslocación de H^+ cuando ambas partes se encuentran unidas.

La subunidad catalítica de la H^+ -ATP sintasa es la subunidad β del subcomplejo F_1 (β - F_1 -ATPasa) que en último término controla el proceso de transducción de energía. A diferencia de otras subunidades del mismo complejo (α y γ) (Breen, 1988; Neckelmann y cols., 1989), esta subunidad está codificada por un único gen en el genoma nuclear humano

(Neckelmann y cols., 1989) y de rata (Izquierdo y cols., 1995) y su transcripción genera una especie única de mRNA (Ricart y cols., 1997). Esto hace que los cambios en la cantidad relativa de la proteína sólo puedan reflejar cambios en la actividad transcripcional del gen y/o traduccional del mensajero. Se ha descrito que los cambios en la cantidad relativa de la proteína durante el desarrollo del hígado de rata (Izquierdo y cols., 1995) discurren paralelos al número de mitocondrias por hepatocito (Rohr y cols., 1971; Hommes, 1975) y al contenido de DNA mitocondrial (Cantatore y cols., 1986; Ostronoff y cols., 1996). Además, en levadura se ha propuesto que esta subunidad es esencial en la organización de la membrana interna mitocondrial, por lo que parece clave para la biogénesis de la mitocondria (Ebner y Schatz, 1973; Paumard y cols., 2002; Arselin y cols., 2004).

1.1.1.2. Especies reactivas de oxígeno.

En la mitocondria se generan la mayoría de especies reactivas de oxígeno (ROS) como subproducto de la fosforilación oxidativa. Se sabe que, del 1 al 3% del oxígeno consumido por la mitocondria no es completamente reducido, generándose radicales de oxígeno (Boveris y Chance, 1973). Esto ocurre normalmente porque los complejos I (Boveris y Chance, 1973; Liu y cols., 2002) y III (Boveris y Chance, 1973; Nohl y cols., 2003) pueden donar un electrón directamente al oxígeno generando el ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), un potente agente oxidante (Fig. 1.2). Este ion puede ser destoxificado por la enzima Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD), que se encuentra en un alto nivel de expresión en la matriz mitocondrial, generando peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La deficiencia en la actividad de la enzima Mn-SOD en humanos se ha asociado con enfermedades crónicas severas como cáncer de ovario y diabetes tipo I (Lebovitz y cols., 1996). El peróxido de hidrógeno se puede convertir en agua por la enzima glutathion peroxidasa (GSH-PX), pero esta reacción se encuentra limitada por la disponibilidad de glutathion en la matriz mitocondrial (Batandier y cols., 2002). El H_2O_2 puede atravesar fácilmente la membrana mitocondrial hacia el citoplasma (Antunes y Cadenas, 2000) o si hay metales de transición reducidos (por ejemplo, Fe^{2+}) en la matriz puede generar el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), altamente reactivo. A pesar de la baja difusión del ion superóxido, se ha propuesto que pasa al citosol desde el espacio intermembrana (Han y cols., 2001a) y allí es convertido en agua oxigenada por la enzima citosólica Cu/Zn-SOD. El agua oxigenada puede ser eliminada en el citosol por la catalasa o la glutathion peroxidasa generando agua, y de igual forma puede reaccionar con metales de transición reducidos ganando un electrón dando lugar al radical hidroxilo.

En condiciones normales los sistemas antioxidantes de la célula son capaces de neutralizar los ROS y, en consecuencia, sus efectos negativos. Pero la producción de ROS puede estar intensificada por un elevado metabolismo energético y/o por mutaciones que afectan a la actividad energética de la célula y/o a las defensas antioxidantes. La mitocondria constituye la primera diana del efecto negativo de los ROS (Nulton-Persson y Szweda, 2001). Se producen alteraciones en la membrana mitocondrial ocasionadas por la oxidación de lípidos y daños en los residuos tioles alterando la permeabilidad de la misma

(Antunes y cols., 1996). Además, la proximidad física del sitio de producción de ROS favorece la alteración de proteínas involucradas en la cadena de transporte de electrones, en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y en la reparación de mtDNA (Almeida y cols., 1999). El mtDNA es particularmente sensible a los ROS ya que no dispone de la protección con histonas que posee el nDNA ni tampoco de intrones, lo que hace que las alteraciones genéticas que puedan resultar sean siempre mutagénicas. Esto hace pensar que los ROS son responsables de un gran número de enfermedades mitocondriales (Antunes y cols., 1996). Todas estas alteraciones ocasionan una disfunción mitocondrial que conlleva un estrés oxidativo celular (Chandra y cols., 2000; Klaunig y Kamendulis, 2004) y la posterior señalización para la ejecución de la apoptosis (Raha y Robinson, 2000; Chandra y cols., 2000; Klaunig y Kamendulis, 2004). El daño oxidativo es responsable, en primera instancia, de la generación de diversos cánceres humanos (Petros y cols., 2005) y del envejecimiento (Brandon y cols., 2006).

1.1.2. Implicación de la mitocondria en muerte celular.

La clasificación de las vías de muerte celular se ha basado principalmente en criterios morfológicos. De esta manera, podemos diferenciar entre la apoptosis, en la que se produce una condensación del DNA visible, la muerte autofágica, en la que se observa la presencia de vacuolas autofágicas en el citosol, la catástrofe mitótica, que se caracteriza por fallos en la ejecución de la mitosis y la necrosis, en la que se da un hinchamiento específico de las organelas en el citosol (Jaattela, 2004). De todos estos tipos de muerte celular la apoptosis es la más frecuente, y en consecuencia, la más estudiada.

1.1.2.1. El papel de la mitocondria en apoptosis.

La ejecución de muerte celular por apoptosis es muy importante durante el desarrollo, en el mantenimiento de la homeostasis del organismo y en la eliminación de linfocitos autorreactivos y de células neoplásicas, dañadas o infectadas (Jacobson y cols., 1997). La apoptosis está mediada por un patrón molecular que culmina en la activación de una familia de cisteín-proteasas, conocidas como caspasas, que son las responsables de controlar la destrucción celular a través de cortes proteolíticos muy específicos (Zimmermann y cols., 2001). Una vez que las células han llevado a cabo el proceso apoptótico son eliminadas por fagocitos sin que se produzca la liberación del contenido celular, por lo que no se produce una respuesta inflamatoria.

En general, los estímulos que inducen apoptosis pueden ser divididos en dos grupos, los estímulos fisiológicos y los estímulos de estrés. Los estímulos fisiológicos desencadenan la apoptosis por mediación de receptores externos de muerte. La iniciación de la apoptosis inducida por estrés involucra a la mitocondria en los primeros pasos de la cascada de señalización intracelular. Por lo tanto, existen dos cascadas de activación de la apoptosis, la vía extrínseca (Kaltschmidt y cols., 2000) y la vía intrínseca (Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003) (Figura 1.4).

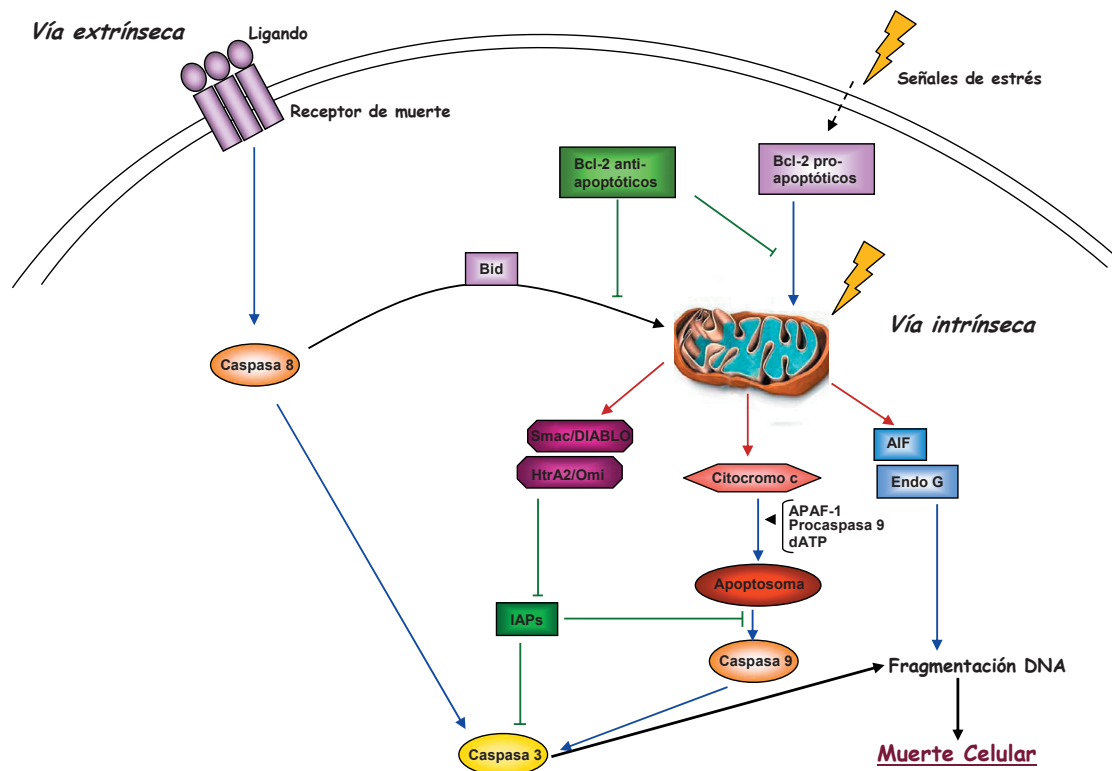


Figura 1.4. **Ejecución de muerte celular por apoptosis.** La apoptosis puede ser iniciada por receptores de muerte (vía extrínseca) que actúan a través de la caspasa 8 o por la mitocondria (vía intrínseca) en respuesta a señales de estrés, tanto extracelulares como intracelulares, que actúa liberando proteínas de su interior lo que conlleva la activación de la caspasa 9. Además, la muerte celular por apoptosis está controlada por las familias de proteínas de Bcl-2 y de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs). Ambos patrones convergen en la activación de las caspasas efectoras (caspasa 3) que actúa sobre sustratos vitales. Las dos vías de muerte quedan comunicadas a través del miembro pro-apoptótico Bid de la familia de Bcl-2.

En la vía extrínseca, el ligando de Fas (FasL) o el factor α de necrosis tumoral (TNF α) se unen a su receptor de forma que se origina una agregación de receptores lo que facilita el reclutamiento de proteínas adaptadoras de muerte, FADD (*Fas-Associated Death Domain protein*) (Muzio y cols., 1996), en el lado citoplasmático de la membrana. Las pro-caspasas 8 y/o 10 son reclutadas al complejo donde, debido a la proximidad, pueden experimentar un autoprocesamiento originándose caspasas maduras y activas (Green y Kroemer, 1998). La caspasa 8 transfiere la señal apoptótica a la caspasa 3, que ejecuta apoptosis mediante el corte y degradación de un gran número de proteínas intracelulares, incluyendo proteínas que regulan la progresión del ciclo celular y proteínas estructurales del núcleo y del citoesqueleto (Wajant, 2002) (Figura 1.4). El corte de estas proteínas origina las alteraciones morfológicas indicativas de la apoptosis, la fragmentación del DNA y el *blebbing* de la membrana citoplasmática (Wajant, 2002). La caspasa 8 también puede transferir la señal apoptótica a la mitocondria a través de miembros de la familia de proteínas Bcl-2. La proteína Bid se activa mediante proteólisis por la caspasa 8 de manera que el fragmento C-terminal se transloca a la mitocondria donde se inicia la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Li y cols., 1998) (Figura 1.4). De esta manera, este patrón de señalización puede

emplear la vía de la mitocondria para intensificar la señal apoptótica.

En la vía intrínseca se integran señales de muerte producidas por alteraciones en el estado metabólico de la célula, daño en el DNA u otras situaciones de estrés a través de la mitocondria. A pesar de que no se conoce mucho acerca de la iniciación de la apoptosis por esta vía, se sabe que las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel central en la transferencia de la señal apoptótica a la mitocondria (Green y Kroemer, 1998). En concreto, los miembros pro-apoptóticos de la familia, Bax y Bak, juegan un papel decisivo en la inducción de la disfunción mitocondrial que se produce durante la apoptosis (Adams y Cory, 2001). En este contexto, la mitocondria ejerce el papel de un “guardameta” que atrapa una gran variedad de proteínas pro-apoptóticas previniendo su función en el citosol. La salida de estas proteínas de la mitocondria al citosol, mediada por la acción de las proteínas Bak y Bax, induce la apoptosis (Figura 1.4). La primera proteína que sale de la mitocondria es citocromo c (Liu y cols., 1996; Goldstein y cols., 2005). Citocromo c inicia la formación en el citosol de un complejo compuesto por el factor apoptótico Apaf-1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor*), dATP y pro-caspasa 9 (Liu y cols., 1996). A este complejo se le ha denominado apoptosoma (Figura 1.4). La maduración proteolítica de la caspasa 9 se produce mediante un proceso autocatalítico dentro de cada complejo. Una vez activada la caspasa 9, la señal de muerte es transferida a la caspasa 3 que comienza la fase ejecutora de la apoptosis (Figura 1.4).

La célula, en respuesta a estímulos apoptóticos, posee mecanismos adicionales para regular la actividad de las caspasas y decidir, en último término, si se ejecuta o no el programa de muerte celular. Los inhibidores de la apoptosis (IAPs) suprimen la muerte celular mediante la unión directa e inactivación de las caspasas (Deveraux y cols., 1999). La mitocondria también contribuye a la regulación de estos inhibidores. En respuesta a una señal de muerte sostenida, además de citocromo c salen al citosol otros factores apoptogénicos, tales como Smac/DIABLO (Verhagen y cols., 2000; Du y cols., 2000) y Omi/HtrA2 (Faccio y cols., 2000), que se unen a IAPs liberando a las caspasas de sus efectos inhibitorios (Figura 1.4).

Al contrario que citocromo c o Smac/DIABLO, la salida de las proteínas AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) (Susin y cols., 1999) y Endonucleasa G (EndoG) (Li y cols., 2001) del espacio intermembrana de la mitocondria no inducen activación de caspasa. Estas dos moléculas ejercen su acción directamente en el núcleo donde promueven la fragmentación del DNA (Figura 1.4).

1.1.2.2. Permeabilización de la membrana mitocondrial.

La salida de proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria es uno de los eventos principales en el proceso apoptótico mitocondrial, por lo que la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP: *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) constituye un punto clave. Sin embargo, los mecanismos de la permeabilización de la membrana mitocondrial generan todavía mucha controversia.

Debido a su importancia, la gran mayoría de los estudios realizados en el conocimiento de la salida de proteínas de la mitocondria se han focalizado en la salida de citocromo c.

Las proteínas de la familia Bcl-2 son las encargadas de controlar MOMP (Green y Kroemer, 1998; Kuwana y Newmeyer, 2003). Éstas contienen uno o más dominios de homología BH (*Bcl-2 Homology*) y se pueden dividir en dos grandes grupos dependiendo de si promueven (Bax, Bak, Bid) o inhiben apoptosis (Bcl-2, Bcl-X_L). Se ha propuesto que la mitocondria puede liberar proteínas del espacio intermembrana a través dos mecanismos diferentes. El primero, a través de la permeabilización transitoria de la mitocondria (MPT: *Mitochondrial Permeability Transition*) que ocurre principalmente en respuesta a la salida de Ca²⁺ del retículo endoplásmico (Petit y cols., 1998; Yang y Cortopassi, 1998) y que implica la participación de transportadores mitocondriales de la membrana externa VDAC (*Voltage Dependent Anion Channel*) (Vander Heiden y cols., 2000) y de la membrana interna ANT (Vieira y cols., 2000). El segundo mecanismo ocurre a través de la permeabilización de la membrana externa producida por la familia Bcl-2. Se han descrito varios modelos de permeabilización de la mitocondria mediada por estas proteínas. Una hipótesis es la generación de poros en la membrana externa de la mitocondria mediada por canales formados por miembros pro-apoptóticos de esta familia al integrarse en la membrana mitocondrial (Schendel y cols., 1997). La existencia de diferentes mecanismos explica, en gran medida, la gran variedad de respuestas de la mitocondria a numerosos estímulos apoptóticos en diferentes líneas celulares.

Cuando el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) se disipa se origina la pérdida de las funciones mitocondriales. Si la permeabilización de la membrana mitocondrial se lleva a cabo por las proteínas Bcl-2, la respiración de la mitocondria sólo se ve alterada de forma indirecta. Las caspasas también pueden ejercer su acción en la mitocondria al poder entrar una vez activadas. De esta manera, se pueden proteolizar sustratos de la cadena de transporte de electrones lo que conllevaría a una inhibición de la respiración y un incremento de la producción de ROS (Ricci y cols., 2003). En esa situación, la H⁺-ATP sintasa puede funcionar en sentido reverso mientras exista ATP en el interior de la mitocondria (Matsuyama y cols., 2000; Almeida y cols., 2001; Santamaria y cols., 2006). Cuando los niveles de ATP caen, el $\Delta\psi_m$ se disipa completamente.

1.1.2.3. Muerte celular independiente de caspasas.

La muerte celular por apoptosis es mediada por patrones moleculares que culminan en la activación de las caspasas. Sin embargo, existen evidencias que indican que células que han sido tratadas con estímulos apoptóticos pueden iniciar un programa de muerte que no requiere activación de caspasas, la muerte celular independiente de caspasa (CICD-*Caspase-independent Cell Death*) (Leist y Jaattela, 2001; Chipuk y Green, 2005). Este tipo de muerte ocurre cuando los inhibidores de las caspasas están presentes, o cuando el patrón apoptótico se encuentra genéticamente alterado. La morfología de una célula durante CICD presenta alteraciones mínimas hasta fases tardías del proceso, lo que contrasta enormemente

con la apoptosis y hace que no se pueda estimar este tipo de muerte por técnicas clásicas (Chipuk y Grenn, 2005).

Como en la apoptosis clásica, los mecanismos de muerte independientes de caspasas también están mediados por receptores de muerte y por alteraciones en la mitocondria. Las proteasas implicadas en este tipo de muerte celular son las catepsinas, calpaínas, serín proteasas y el proteasoma. Se han visto evidencias de que estas proteasas se encuentran también implicadas en la permeabilización de la membrana mitocondrial (Kroemer y Martin, 2005). La permeabilización de la membrana de la mitocondria permite la salida de proteínas que comprometen a la célula a muerte sin la activación de caspasas, como son AIF, EndoG y Omi/HtrA2.

Ambas vías, tanto la caspasa-dependiente como la caspasa-independiente, parece que son activadas en muchos casos de forma simultánea (Leist y Jaattela, 2001). En cada sistema el mecanismo principal de muerte y el fenotipo que presentarán las células dependerá de la velocidad relativa de cada proceso. La caracterización de la influencia de ambas vías en distintos modelos es muy importante debido a su implicación en numerosas enfermedades. Por ejemplo, las células tumorales de muchos tipos de cáncer presentan defectos en la señalización de las vías apoptóticas clásicas permitiendo así que las vías de muerte caspasa independiente adquieran un papel predominante en el tipo de muerte celular que puedan sufrir (Kerr y cols., 1994).

1.1.3. Morfología y dinámica de la mitocondria.

La mitocondria posee dos membranas que la dividen en cuatro compartimentos, membrana externa, espacio intermembrana, membrana interna y matriz mitocondrial. La membrana interna se encuentra plegada formando crestas, las cuales albergan los macro-complejos de la cadena de transporte de electrones y de la síntesis de ATP que controlan el metabolismo celular. La mitocondria se encuentra formando redes tubulares que de manera continua cambia su forma, tamaño, distribución y número dentro de la célula durante el desarrollo, el ciclo celular (Martínez-Díez y cols., 2006; Detmer y Chan, 2007) o en respuesta a diferentes estímulos (Rojo y cols., 1998). Uno de los cambios más espectaculares de la morfología mitocondrial ocurre durante la apoptosis, donde la fragmentación de la red mitocondrial es uno de los primeros eventos que sucede en este programa de muerte celular (Santamaría y cols., 2006). Además, la distribución y morfología de la mitocondria varía dependiendo del tipo celular (Collins y Bootman, 2003). La dinámica de la mitocondria está controlada por eventos de fusión-fisión que se encuentran estrechamente relacionados con su morfología e inciden directamente en el metabolismo y la muerte celular (Chen y Chan, 2005).

La morfología de la mitocondria está relacionada con la producción de energía en la célula. El plegamiento de las crestas de la membrana interna y la condensación de la matriz de la mitocondria correlaciona con su estado bioenergético (Hackenbrock, 1966; Scalettar y cols., 1991). Aberraciones en la morfología de las crestas están acompañadas de

alteraciones en el metabolismo (John y cols., 2005). Más recientemente, se han establecido relaciones entre el estado bioenergético de la célula y la maquinaria de fusión-fisión. (Bach y cols., 2003; Chen y Chan, 2005). Una elevada respiración de la célula está correlacionada con una red interconectada de mitocondrias con un elevado número de crestas, mientras que una baja actividad de la fosforilación oxidativa correlaciona con mitocondrias fragmentadas con espacios intracrestas muy pequeños. De esta forma, se modificará el metabolismo según los requerimientos energéticos de la célula remodelando la red mitocondrial. Es por tanto fundamental mantener un balance de fusión-fisión mitocondrial ya que, en caso contrario, se incrementaría la susceptibilidad a desarrollar defectos metabólicos y, en consecuencia, enfermedades. Un claro ejemplo se muestra en la proliferación de la célula. Estudios en fibroblastos y células de osteosarcoma muestran que la célula se vuelve filamentosa e interconectada durante la fase G1, mientras que su apariencia es fragmentada en fase S (Barni y cols., 1996; Margineantu y cols., 2002; Martinez-Diez y cols., 2006).

1.2. CÁNCER Y MITOCONDRIA.

Dada la complejidad de los programas celulares que controlan la biogénesis y funcionalidad de la mitocondria, y la localización dual de sus constituyentes en dos genomas diferentes, no es de extrañar que existan un gran número de enfermedades humanas que están asociadas con defectos en las funciones bioenergética y/o apoptótica de la mitocondria. La patología mitocondrial es muy extensa y engloba enfermedades con fenotipo muy diverso, como pueden ser, enfermedades neurodegenerativas (Ortega y Cuezva, 2004), enfermedades metabólicas como la diabetes o síndrome metabólico (Wallace, 2005b) y el cáncer (Cuezva y cols., 2002; Wallace, 2005a; Chatterjee y cols., 2006; Brandon y cols., 2006). Más recientes son los estudios que relacionan el envejecimiento con la mitocondria (Trifunovic y cols., 2004; Wallace, 2005b).

El cáncer constituye uno de los diagnósticos más temidos en clínica. Un cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos: (i) el aumento de la proliferación de un grupo de células dando lugar a un tumor o neoplasia, que se caracteriza por un crecimiento excesivo y descontrolado, y (ii) la posterior adquisición por estas células de la capacidad invasiva que les permite escapar de su sitio natural en el organismo y colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos, proceso conocido como metástasis, provocando finalmente la muerte del paciente. Existen unos 200 tipos de células distintos en nuestro organismo, y si bien en principio cualquiera de ellas puede potencialmente generar un tumor, en realidad el 90% de los tumores son generados por células epiteliales, denominados carcinomas. Los otros tipos mayoritarios de cánceres son los sarcomas, derivados de células del tejido conectivo, o muscular, las leucemias, linfomas, y mielomas, originados por células de la sangre, y los neuroblastomas y gliomas, que derivan de células del sistema nervioso.

Los cánceres se clasifican en categorías según el órgano o tejido en el que se originan, con subdivisiones de acuerdo con el tipo específico de célula, su localización en el organismo

y la estructura del tumor. Así, se consideran un centenar de cánceres, cuya clasificación no tendría sentido si no fuera por el hecho de que cada tipo es una entidad distinta. Los distintos cánceres presentan características y comportamientos específicos, lo cual hace que realmente sean enfermedades diferentes. Ello se debe no sólo al tipo celular en el que se originan, sino también a las causas que lo produjeron, factores ambos ligados. Así, los cánceres de piel son más fácilmente desencadenados por la radiación ultravioleta solar que los cánceres de riñón; pero mientras que los carcinomas de células basales, derivados de queratinocitos epidérmicos, son muy poco invasivos y por ello fáciles de eliminar por cirugía, los melanomas, cuyo origen son los melanocitos, causan metástasis con gran rapidez y son generalmente fatales.

1.2.1. El ciclo celular.

La mayoría de las células normales no proliferan a menos que no sean estimuladas con factores de crecimiento mitogénicos. Además, determinadas señales extracelulares pueden persuadir a la célula para entrar en un estado post-mitótico (diferenciación o senescencia) del cual nunca re-emergerá para proliferar de nuevo. Estas señales son integradas y procesadas dentro de la célula por un conjunto de circuitos complejos, de manera que la célula decide si es apropiado el crecimiento y la división (Golias y cols., 2004). Puesto que la proliferación de la célula cancerígena es aberrante, podríamos pensar que las células cancerígenas poseen un sistema distinto para la programación del crecimiento y la división. En la realidad no existen grandes diferencias en los circuitos empleados por las células normales y neoplásicas. El estado constante de proliferación de la célula cancerígena indica que el control del ciclo celular está siendo influenciado no sólo por proteínas normales, sino también por proteínas oncogénicas que perturban los mecanismos normales de control.

Cuando las células de mamífero se encuentran en un entorno que permite una multiplicación exponencial exhiben un complejo ciclo de crecimiento y división que denominamos ciclo celular (Golias y cols., 2004) (Figura 1.5). Una vez que la célula proviene de una división celular debe decidir si inicia de nuevo un proceso de crecimiento y división o permanece en un estado de no crecimiento o quiescencia denominado G_0 . Esta decisión está determinada por las señales mitogénicas del medio. Si por el contrario la célula decide continuar de forma activa en el ciclo celular, debe prepararse para la siguiente división. Esta preparación consiste principalmente en doblar las cantidades de los constituyentes macromoleculares de la célula. Mientras que la acumulación de RNA y de proteínas se inicia inmediatamente después de la división celular y de forma continua hasta la siguiente división celular, la replicación del DNA ocurre en un momento determinado del ciclo celular, en la fase de síntesis o fase S. El periodo entre el nacimiento de la célula hija y la fase S se denomina fase G_1 (primer gap). Al final de esta fase, en el denominado punto de restricción (punto R), la célula toma decisiones críticas acerca del crecimiento frente a la quiescencia, y si como célula quiescente se diferencia (Figura 1.5). Terminando la fase S, la célula podría entrar directamente en la fase de división o mitosis (fase M). Sin embargo, la

gran mayoría de las células tienen una fase previa, fase G_2 (segundo gap) donde la célula se prepara para entrar en mitosis. La fase M incluye a su vez cuatro etapas, profase, metafase, anafase y telofase. La división del citoplasma que permite la formación de dos células hijas nuevas se denomina citocinesis.

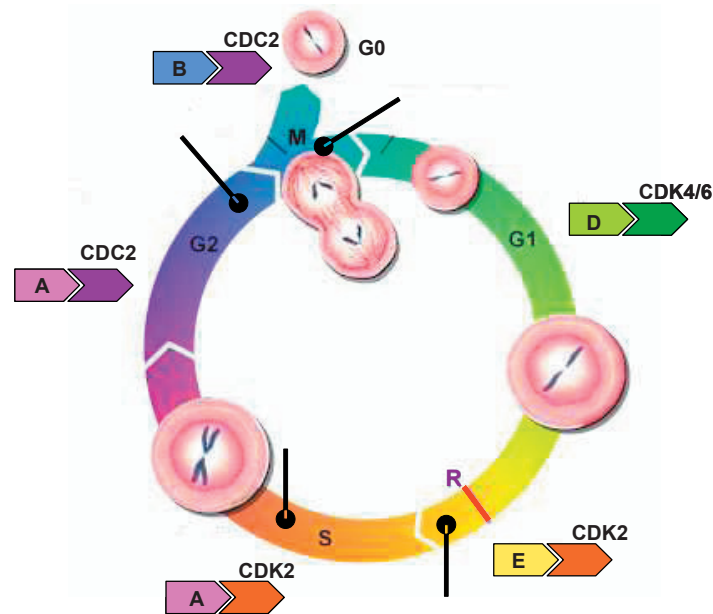


Figura 1.5. **El ciclo celular de mamíferos.** El ciclo de crecimiento y división de mamíferos está dividido en cuatro fases. En la primera fase (G_1) las células crecen y comienzan la síntesis de constituyentes macromoleculares. A continuación las células duplican su material genético durante la fase de síntesis (S). Durante la siguiente fase (G_2) la célula se prepara para su propia división. Durante la fase de división o mitosis (M) los cromosomas se separan y se segregan a las células hijas. La progresión del ciclo celular está controlada por quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (■) y ciclinas (□). Cada CDK es regulada por una o varias ciclinas siendo estos complejos activos en un periodo determinado del ciclo celular. —●— Puntos de chequeo que imponen un control de calidad de manera que la célula no puede progresar en el ciclo si no se cumplen los requisitos de la fase. **R**- punto de restricción, donde la célula debe tomar la decisión de continuar en la progresión del ciclo y dividirse, permanecer en fase G_1 o entrar en quiescencia (G_0).

El control del ciclo celular es ejercido directamente por un grupo de proteínas quinasa denominadas quinasas dependientes de ciclina (CDKs-*Cyclin-dependent Kinases*) ya que su actividad depende de la asociación a una subunidad reguladora, denominada ciclina, (Golias y cols., 2004). Los niveles de las ciclinas fluctúan drásticamente en las distintas fases del ciclo celular. De este modo, la acumulación gradual de una ciclina y su rápida degradación tiene una gran importancia ya que así el ciclo celular sólo se puede mover en una dirección. Los complejos de CDK-ciclina son los responsables de emitir señales, mediante la fosforilación de sustratos, y así continuar avanzando a lo largo del ciclo celular. Existen distintos tipos de CDKs y de ciclinas que actúan en las distintas fases del ciclo celular (Figura 1.5). La regulación del ciclo celular no sólo está ejercida a través de las ciclinas. Existen otros niveles de regulación que modulan la actividad de las CDKs. De

estos controladores adicionales, los más relevantes son los denominados genéricamente inhibidores de CDKs (CdKIs). Muchas de estas proteínas son capaces de antagonizar las actividades de los complejos CDK-ciclina.

1.2.1.1. El control del ciclo celular.

La célula ha desarrollado una serie de mecanismos que le permiten monitorizar cada paso en la progresión del ciclo celular, de manera que sólo si se han completado satisfactoriamente los requisitos de una fase la célula comienza la siguiente fase; si por el contrario existe algún problema en un punto determinado, la célula no avanzará en el ciclo celular hasta que no se haya solucionado completamente. Estos mecanismos de control se encuentran operando en momentos concretos del ciclo celular por lo que se han denominado puntos de control o *checkpoints* (Kastan y Bartek, 2004) (Figura 1.5). El primer control lo encontramos en la frontera de las fases G₁/S en el que se verifica la integridad del genoma. Durante la fase S cualquier daño en el DNA parará la replicación del genoma hasta que sea reparado. Un tercer punto de control no permitirá el paso de fase G₂ a fase M si la duplicación del DNA en fase S no ha sido completada o si el DNA se encuentra dañado. Por último, durante la mitosis existe un punto de control en anafase que chequea el buen posicionamiento de los cromosomas en el huso acromático. La proteína supresora de tumores p53, conocida también como el “guardián del genoma”, juega un papel fundamental en el control del ciclo celular y en apoptosis (Vousden y Lu, 2002; Okorokov, 2003). En situaciones normales los niveles de expresión de p53 son muy bajos debido a su rápida señalización para degradación. En respuesta a daño del DNA, u otra señal de estrés, p53 se estabiliza y se incrementa la cantidad de proteína originando la parada del ciclo celular. p53 induce la reparación del DNA al activar la transcripción de proteínas involucradas en la reparación, o puede señalizar a apoptosis si el daño es muy grande. p53 se encuentra mutada en numerosos casos de tumores humanos.

Las células deben decidir si se encuentran metabólicamente preparadas para afrontar la demanda energética que supone la proliferación celular. Recientemente, se ha demostrado cómo la restricción de glucosa puede inducir una parada reversible del ciclo celular en presencia de metabolitos suficientes para mantener la supervivencia y funcionalidad de la célula existente (Jones y cols., 2005). Asimismo, la inhibición farmacológica de la fosforilación oxidativa (Van den Bogert y cols., 1988; Santamaria y cols., 2006), o bien debida a alteraciones genéticas que comprometen la bioenergética de la mitocondria (Mandal y cols., 2005), promueve una parada en fase G₁ debido a limitaciones en los niveles de ATP. Este punto de control metabólico es regulado por la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK- *AMP-activated Protein Kinase*), considerada como el sensor energético de la célula (Jones y cols., 2005). Estudios recientes han demostrado que la parada del ciclo celular inducida por AMPK puede llevarse a cabo mediante la acción de p53. La activación de AMPK promueve la fosforilación de p53 en Ser15 lo que previene su degradación permitiendo su acumulación y parada del ciclo celular (Jones y cols., 2005).

1.2.1.2. Traducción y ciclo celular.

Los mRNA eucariotas están modificados en su posición 5' con una estructura denominada cap (m⁷GppN, donde N es un nucleótido) (Shatkin, 1976). El cap juega un papel fundamental en la iniciación de la traducción facilitando la unión del ribosoma a la región 5' del mRNA. Esto se lleva a cabo a través de la interacción del cap con el factor de iniciación de la traducción eIF4E (Sonenberg, 1996). La actividad de eIF4E se regula por la unión reversible con una familia de polipéptidos denominados proteínas de unión a 4E (4E-BPs). La interacción eIF4E/4E-BPs se regula por fosforilación. La hipofosforilación de las 4E-BPs promueve la interacción con el eIF4E (Pyronnet y cols., 2000) y la inhibición de la traducción cap-dependiente (Beretta y cols., 1996). Aunque la iniciación de la traducción cap-dependiente se pensó que era la forma prevalente de unión del ribosoma al mRNA, existe actualmente una lista de mRNA virales y celulares que no necesitan la región cap, y en consecuencia el factor eIF4E, para una traducción eficiente (Vagner y cols., 2001). Estos mRNAs poseen una ventaja traduccional sobre otros mRNAs celulares en situaciones en que la traducción cap-dependiente se encuentra inhibida debido a la existencia de pequeñas regiones no codificadas situadas en 5' ó 3' (5' ó 3'UTRs). Estas secuencias reguladoras proporcionan un sitio de unión para la maquinaria traduccional por mecanismos similares a la iniciación interna de la traducción (IRES- *I*nternal *R*ibosome *E*ntry *S*ites), un mecanismo inicialmente descrito para mRNAs virales que no poseen 5'cap (Hellen y Sarnow, 2001). Además, las regiones UTRs proporcionan el sitio de unión de proteínas reguladoras que podrían actuar como sensores del entorno celular enmascarando o no la traducción del mRNA específico, participando de esta manera en la configuración de la funcionalidad global de la mitocondria dentro de la célula en respuesta a cambios en el entorno celular (Izquierdo y Cuezva, 2005).

El grado de síntesis de proteínas varía a lo largo de la progresión del ciclo celular. Cuando la célula entra en mitosis la traducción cap-dependiente está inhibida debido a la hipofosforilación de las proteínas 4E-BP. De esta manera, la traducción dependiente de IRES media el control de la síntesis de proteínas durante el ciclo celular permitiendo la traducción de mRNAs cuyos productos sean requeridos durante la mitosis. Además, se ha visto también una modulación específica de tejido de la traducción mediada por IRES durante el desarrollo (Creancier y cols., 2000).

1.2.1.3. Metabolismo y ciclo celular.

Varios estudios han demostrado un aumento de la actividad de la mitocondria cuando la célula entra en fase G₁ (Van den Bogert y cols., 1988; Herzig y cols., 2000). Sin embargo, la energía durante la progresión del ciclo celular es suministrada por procesos no respiratorios (Klevecz y cols., 2004; Tu y cols., 2005; Reinke y Gatfield, 2006). De hecho, recientemente se ha demostrado cómo en células de mamíferos la ciclina D1, que está involucrada en la fosforilación e inactivación de la proteína retinoblastoma permitiendo que la célula entre en fase S del ciclo celular, inhibe la función mitocondrial (Sakamaki y cols., 2006) y

reprime la actividad de NRF-1 (Wang y cols., 2006), un factor nuclear imprescindible para la expresión transcripcional de genes mitocondriales codificados en el núcleo (Scarpulla, 2002).

Durante la fase G₁, la célula tiene una elevada fosforilación oxidativa para generar cantidades suficientes de ATP para que pueda entrar en fase S y se pueda replicar el genoma. Se ha sugerido que si la célula continuara manteniendo la fosforilación oxidativa durante la replicación del DNA la producción de radicales de oxígeno podría provocar mutaciones en el DNA más fácilmente al no estar protegido por las histonas (Chen y cols., 2007). Esto podría explicar la disminución de la actividad de la respiración y la existencia de mitocondrias con morfología fragmentada durante la fase S del ciclo celular.

1.2.2. Implicación de la mitocondria en cáncer.

El cáncer proviene de una acumulación secuencial de cambios genéticos que liberan a las células neoplásicas de los mecanismos homeostáticos que gobiernan la proliferación normal de las células en los tejidos humanos (Hanahan y Weinberg, 2000) (Figura 1.6). Son numerosas las alteraciones que se han visto en la secuencia del DNA que puedan estar relacionadas en el desarrollo de cada tumor. Un punto principal en el estudio del cáncer ha sido la identificación de genes mutados que se encuentran implicados en oncogénesis, los genes del cáncer (Futreal y cols., 2004). De esta manera, se descubrieron mutaciones que producen oncogenes con una ganancia de función y genes supresores de tumor con una pérdida de función. Ambas clases de genes del cáncer han sido identificados a través de su alteración en células cancerígenas de humanos y animales y por la obtención de fenotipos cancerígenos en modelos experimentales. Las proteínas que son codificadas por estos genes normalmente regulan la proliferación, la diferenciación, la muerte celular (Vogelstein y Kinzler, 2004) y reparación del DNA (Parsons y cols., 1993).

Algunos de los cambios en la expresión de genes son compartidos por muchos tipos de células cancerígenas, mientras que otros parecen ser específicos de uno o un número pequeño de tipos de células cancerígenas que se encuentran en la clínica oncológica. Pero en general, la emergencia de todos los cánceres a partir de tejido normal está gobernada por un conjunto común de mecanismos. La tumorigénesis en humanos es un proceso secuencial y cada paso refleja alteraciones genéticas que conducen a la transformación progresiva de células normales en derivados cada vez más malignos. De hecho, se ha sugerido que el genotipo de las células cancerígenas es una manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que de forma colectiva dictamina el crecimiento maligno (Figura 1.6) (Hanahan y Weinberg, 2000). Estas alteraciones son: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la muerte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión de tejidos y metástasis.

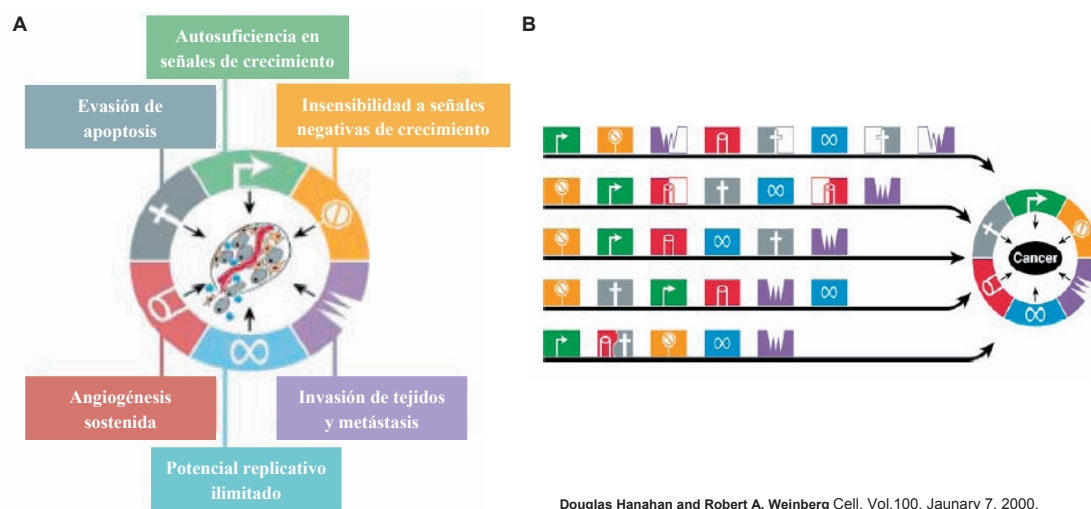


Figura 1.6. **Los marcadores del cáncer.** (A) Capacidades funcionales adquiridas durante el desarrollo tumorigénico en la gran mayoría de los cánceres humanos. (B) El orden en el cual se adquieren estas capacidades funcionales es variable dentro de los distintos tipos y subtipos de cánceres. Además, en algunos casos una mutación particular puede conferir varias capacidades de forma simultánea, disminuyendo el número de pasos para completar la tumorigénesis. En otros tumores, una capacidad puede ser adquirida por la colaboración de diferentes cambios genéticos, incrementando el número de pasos en la progresión tumoral.

Durante los últimos años, estudios de diversos investigadores trabajando en los diferentes aspectos de la fisiología de la mitocondria han revelado alteraciones en el número (López de Heredia y cols., 2000; Cuezva y cols., 2002), la ultraestructura (Hoberman, 1975; Springer, 1980), el proteoma (Simonnet y cols., 2002; Green y Kroemer, 2004; Isidoro y cols., 2004) y la actividad de la mitocondria en cáncer (Modica-Napolitano y Singh, 2004). De este modo, se han evidenciado algunos cambios asociados al metabolismo de la mitocondria en el proceso tumoral (Warburg, 1930; Warburg, 1956b). Además, la invalidación del proceso apoptótico en cáncer se ha visto ligado a la mitocondria (Ferri y Kroemer, 2001) y cada vez son más las mutaciones en el mtDNA que se encuentran ligadas al cáncer (Chatterjee y cols., 2006; Brandon y cols., 2006).

1.2.2.1. Metabolismo energético de las células tumorales.

Varios autores han descrito que alteraciones del metabolismo están asociadas con la función mitocondrial en células cancerígenas, incluyendo una reducción de la oxidación de piruvato y una mayor producción de ácido láctico (Mazurek y cols., 1997), una actividad glutaminolítica aumentada (Fischer y cols., 1997) y una reducción de la oxidación de ácidos grasos (Ockner y cols., 1993). Pero los trabajos pioneros del metabolismo del cáncer y los más importantes se llevaron a cabo por Otto Warburg. En este trabajo se vio que en condiciones de aire saturado de O_2 las células tumorales del líquido ascítico de ratón muestran una mayor contribución de la glucólisis en la producción total de ATP que las células de hígado y de riñón de animales adultos (Warburg, 1930). Este fenómeno se ha denominado “efecto Warburg” y se caracteriza por la existencia en la célula tumoral de glucólisis aeróbica, es decir, una alta producción de lactato a partir de glucosa en presencia

de oxígeno. Han pasado ya 70 años desde que Warburg propusiera su hipótesis y durante la mayor parte del tiempo la hipótesis ha sido básicamente ignorada (Garber, 2006). Desde un principio, esta teoría tuvo detractores (Weinhouse, 1956; Krebs, 1981) y hoy en día hay autores que continúan cuestionándola (Zu y Guppy, 2004). Una de las principales críticas se basa en que la mayoría de los estudios se han realizado con glucosa como único combustible de las células y en muchas ocasiones sólo se habla de ATP glucolítico y no de ATP total producido por la célula. A pesar de ello, una elevada glucólisis se considera una propiedad común de los cánceres humanos, hasta el punto que, se ha insinuado que la bioenergética constituya el séptimo marcador del cáncer a añadir a los ya descritos por Weinberg (Hanahan y Weinberg, 2000). Sin embargo, este tema no deja de generar gran controversia. Por un lado se considera que el efecto Warburg es consecuencia del cáncer y no un mayor contribuidor a él y que el cambio glucolítico no es absolutamente necesario para la transformación (Zu y Guppy, 2004). En el lado opuesto, no sólo se acepta la glucólisis aeróbica, sino que se piensa incluso que es un requerimiento para la transformación, afirmando que el fenotipo glucolítico es requerido para el crecimiento invasivo del tumor (Gatenby y Gillies, 2004).

El aumento de la glucólisis ha sido observado en muchas células cancerígenas con origen en diferentes tejidos (Semenza y cols., 2001; Shaw, 2006), sugiriendo que esta alteración es común en cáncer. De hecho, la incorporación del análogo de glucosa no metabolizable [^{18}F]-deoxi-2-fluoro-D-glucosa (FDG) y su visualización por tomografía de emisión de positrones (PET) se ha convertido en una herramienta valiosa para el diagnóstico y la determinación del estadiaje del tumor de los pacientes con cáncer (Rigo y cols., 1996). En la mayoría de tumores humanos, y de acuerdo con la hipótesis de Warburg, se ha descrito una disminución en la expresión de $\beta\text{-F}_1\text{-ATPasa}$ unido a un aumento de expresión de marcadores de la ruta glucolítica (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005). Esta característica proteómica de los cánceres se ha definido como la “huella bioenergética” y proporciona un marcador de la progresión del tumor en colon, pulmón y mama (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005). Además, esta “huella bioenergética” puede ser un marcador de respuesta celular a quimioterapia (Shin y cols., 2005). Recientemente, se ha visto como la captación de glucosa, estudiada mediante FDG-PET, correlaciona con marcadores proteómicos de la “huella bioenergética” (Lopez-Rios y cols., 2007). Además, se ha descrito como el grado de glucólisis aeróbica en las células cancerígenas depende de la actividad de la fosforilación oxidativa y de los niveles de expresión de los marcadores de la “huella bioenergética” (Lopez-Rios y cols., 2007).

Se han sugerido diferentes mecanismos que alteran el metabolismo energético y que contribuyen al efecto Warburg: mutaciones en genes de la mitocondria, la adaptación a ambientes hipóxicos, señales oncogénicas y una expresión anormal de enzimas metabólicas. Aunque el control metabólico puede hacerse a varios niveles en la vía glucolítica, la mayoría de los estudios sugieren que el control se ejerce principalmente en el transporte y en la

fosforilación de la glucosa. La hipoxia es un regulador del metabolismo energético y puede redirigir a las células cancerígenas a usar la vía glucolítica para generar ATP cuando hay limitación de oxígeno (Semenza, 2003). Bajo estas condiciones, la fosforilación oxidativa no puede realizarse de forma normal debido a la insuficiencia de oxígeno, incluso si las mitocondrias de la célula cancerígena no se encuentran dañadas. Por ello, el incremento de la glucólisis puede verse como una adaptación a hipoxia (Gatenby y Gillies, 2004). La respuesta celular a hipoxia se encuentra regulada por HIF-1 (*Hypoxia-inducible Factor 1*), que activa la expresión de genes implicados en la captación de glucosa y en el proceso de glucólisis (Brahimi-Horn y Pouyssegur, 2005).

Por otro lado, determinadas señales oncogénicas podrían regular los patrones energéticos induciendo glucólisis en las células cancerígenas (Dang y Semenza, 1999). Así, estudios llevados a cabo con células de ratón mostraron cómo la transfección con RAS o SCR oncogénicos conducían a un marcado incremento de la expresión de transportadores de glucosa (Flier y cols., 1987). De igual modo, la activación del oncogén AKT es suficiente para activar el cambio a glucólisis aeróbica haciendo que estas células se vuelvan estrictamente dependientes de la glucosa (Elstrom y cols., 2004; Govindarajan y cols., 2007). En este sentido, varios estudios demuestran que la señalización a través del receptor de insulina activa a Akt y resulta en una estimulación de la captación de glucosa (Ruderman y cols., 1990) y de la actividad hexoquinasa (Gottlob y cols., 2001; Rathmell y cols., 2003). Otro oncogén, BCR-ABL también se ha visto implicado en el control de la glucólisis, y su inhibición por Gleevec parece revertir el efecto Warburg modificando el metabolismo energético de glucolítico a oxidativo (Gottschalk y cols., 2004).

Alteraciones en la expresión de enzimas en células cancerígenas se han relacionado con los cambios metabólicos que causan la glucólisis aeróbica en tumores. El incremento de expresión de hexoquinasa II y su papel en el cambio metabólico se ha estudiado ampliamente (Bustamante y cols., 1981; Mathupala y cols., 2001; Wallace, 2005b; Mathupala y cols., 2006). De este modo, se sabe que en células normales de hígado la enzima glucoquinasa se expresa activamente mientras que la hexoquinasa II no se expresa. Sin embargo, en hepatomas aumenta la expresión de hexoquinasa II a la vez que disminuye la de glucoquinasa (Mathupala y cols., 2001). Además, hexoquinasa II tiene una fuerte afinidad por VDAC (Mathupala y cols., 2006) por lo que se sitúa en la membrana de la mitocondria donde es capaz de unir el ATP mitocondrial y fosforilar moléculas de glucosa que se encuentren disponibles. El rápido procesamiento de la glucosa-6-fosfato por la glucólisis genera excesos de piruvato y NADH, que no pueden ser oxidados por una disminución en la funcionalidad mitocondrial en cáncer (Wallace, 2005a). Consecuentemente, los metabolitos son convertidos a lactato.

Recientemente, se ha visto que la expresión de TKTL1, una enzima similar a la transcetolasa, está aumentada en una gran variedad de cánceres humanos de diferentes tejidos (Coy y cols., 2005). Esta enzima con actividad cetolasa es capaz de transformar

la xilulosa-5 fosfato en gliceraldehido-3-fosfato, que puede ser canalizado por la ruta glucolítica para generar ATP y lactato. Los autores sugieren que la transcetolasa regula el flujo metabólico de la glucosa en la ruta de las pentosas fosfato y que una expresión aumentada de la enzima incrementaría esta actividad produciéndose una gran cantidad de pentosa-5-fosfato y NADH necesarios para el crecimiento del tumor, y generar lactato a través del intermediario gliceraldehido-3-fosfato (Coy y cols., 2005). Hay que destacar que, la inhibición de TKTL1 con oxitiamina parece tener actividad antitumoral (Rais y cols., 1999).

1.2.2.2. Mutaciones del genoma mitocondrial y nuclear en cáncer.

Aunque el mtDNA representa menos del 10% del DNA celular, sus productos son muy importantes para la funcionalidad de la célula. El descubrimiento de la relación entre mutaciones en genes mitocondriales, implicados en la función bioenergética, codificados en el genoma nuclear con mutaciones cancerígenas (Niemann y Muller, 2000; Baysal y cols., 2000; Astuti y cols., 2001; Habano y cols., 2003; Neumann y cols., 2004; Lehtonen y cols., 2004) hizo pensar que mutaciones en el mtDNA podrían también contribuir al cáncer. En concreto, deleciones, mutaciones puntuales, inserciones y duplicaciones se encuentran asociadas a tumores humanos específicos (Clayton y Vinograd, 1969; Selvanayagam y Rajaraman, 1996; Grossman y Shoubbridge, 1996; Richard y cols., 2000; Penta y cols., 2001; Chatterjee y cols., 2006). Además, se ha visto que algunas de estas mutaciones pueden contribuir a la oncogenicidad de los tumores. Así, la introducción de una mutación patogénica conocida del mtDNA promovió un incremento de la tumorigenicidad de una línea celular tumoral de próstata (Petros y cols., 2005). Las mutaciones cancerígenas del mtDNA pueden provenir de la línea germinal y predisponer a desarrollar cáncer (Liu, 2003; Canter y cols., 2005) o de mutaciones somáticas en los mtDNA de los tejidos y participar en los procesos de progresión tumoral.

A pesar de todos los estudios realizados sobre mutaciones del mtDNA en cáncer, no se conoce cómo impactan estas mutaciones en la funcionalidad mitocondrial y si son causa o consecuencia del proceso carcinogénico. En este sentido, se ha propuesto que las mutaciones en el mtDNA juegan un papel fundamental en la etiología del cáncer de forma coherente con la hipótesis de Warburg (Brandon y cols., 2006). Así, las mutaciones más deletéreas son tumorigénicas y originan un incremento en la producción de ROS debido a la inhibición de la cadena de transporte de electrones. En esta primera fase el tumor es hipóxico y puede tolerar la deficiencia de la fosforilación oxidativa generando ATP mediante la glucólisis. Cuando el tumor se vasculariza o metastasiza se encuentra en ambientes más ricos de oxígeno. En este punto las mutaciones severas se vuelven desventajosas y se pierden por segregación replicativa; las mutaciones adaptativas menos deletéreas se adquieren regresando a genotipos del mtDNA más oxidativos y favorables. Esto explicaría, por ejemplo, por qué la deleción en el gen NDI de los carcinomas renales primarios se encontró ausente en las subsiguientes metástasis del mismo paciente (Horton

y cols., 1996).

Por otro lado, la introducción de células con el mtDNA delecionado (ρ^0) en ratones *nude* ha dado resultados conflictivos en cuanto que algunos autores muestran un incremento de la tumorigenicidad de las células ρ^0 (Morais y cols., 1994), mientras que otros demuestran lo contrario (Cavalli y cols., 1997). De hecho, la relevancia de los estudios realizados con células ρ^0 es incierta puesto que es inusual encontrar delecionado todo el mtDNA en un tumor. Por esta razón, se desarrollaron nuevos estudios con células que llevaran mutaciones puntuales o deleciones parciales del mtDNA. Así, se ha demostrado que carcinomas o células normales que tienen el mtDNA parcialmente delecionado poseen un poder invasivo incrementado, una expresión de marcadores específicos de tumores, la mitocondria desacoplada y un elevado nivel de expresión de proteínas apoptóticas (Amuthan y cols., 2001; Amuthan y cols., 2002). Esta respuesta del fenotipo de la mitocondria se puede reproducir al tratar las células parentales, con el mtDNA intacto, con desacoplantes de la mitocondria (Amuthan y cols., 2001; Amuthan y cols., 2002). Estos resultados refuerzan la idea de que una función mitocondrial deteriorada, bien por la existencia de mutaciones en el mtDNA o bien por la acción de inhibidores de su actividad transductora de la energía, es responsable de promover alteraciones en el fenotipo metabólico de las células cancerígenas que contribuyen a su patogenicidad.

1.2.2.3. Evasión de apoptosis.

La mitocondria juega un papel muy importante en el control de la apoptosis, un proceso biológico fundamental para que las células mueran de forma programada. La ejecución de apoptosis es crítica en el desarrollo del cáncer y en la respuesta celular a agentes anticancerígenos (Kasibhatla y Tseng, 2003). De hecho, uno de los marcadores del cáncer es la resistencia de las células del tumor a inducir apoptosis. Alteraciones en diversos reguladores apoptóticos pertenecientes a la ruta intrínseca confieren a las células neoplásicas una ventaja selectiva de crecimiento en el ambiente hostil en el que se origina y crece el tumor (Jaattela, 2004). Por un lado, mutaciones en el DNA mitocondrial incrementan la probabilidad de que las células sufran apoptosis (Kujoth y cols., 2005), y por otro lado, sólo las células en el que el patrón apoptótico esté suprimido participan en oncogénesis. La supresión de apoptosis en cáncer está ligada a la inhibición de la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP) (Green y Kroemer, 2004; Galluzzi y cols., 2006). En concreto, la supresión de apoptosis juega un papel fundamental en el desarrollo de cánceres hematológicos, por ejemplo, la transformación de pre-neoplasias (síndrome mielodisplásico de bajo grado), en que las células sufren apoptosis de manera espontánea mediante MOMP, a neoplasias abiertas (leucemia mieloide que deriva del síndrome mielodisplásico) donde MOMP es inhibida (Fontenay y cols., 2006).

La supresión de las señales que desencadenan la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria puede estar originada por diferentes mecanismos. De esta manera, mutaciones patogénicas en el genoma de la mitocondria pueden causar, a través de

mecanismos desconocidos, una reducción de la apoptosis espontánea o inducida por agentes quimioterápicos en las células cancerígenas (Shidara y cols., 2005; Ohta, 2006). Además, el efecto Warburg podría estar ligado mecánicamente a la inhibición de la permeabilización. La enzima glucolítica hexoquinasa II, que se ha visto implicada en el cambio metabólico tumoral, interacciona con la membrana externa mitocondrial e inhibe MOMP cuando se asocia con VDAC (Robey y Hay, 2006). Esta interacción puede estar favorecida mediante la sobreexpresión específica en tumores de isoenzimas de la hexoquinasa que se unen a mitocondria (Mathupala y cols., 2006) o por la activación de la ruta Akt, que estimula la interacción entre hexoquinasa y VDAC (Robey y Hay, 2006).

1.2.2.4. Nueva terapéutica del cáncer.

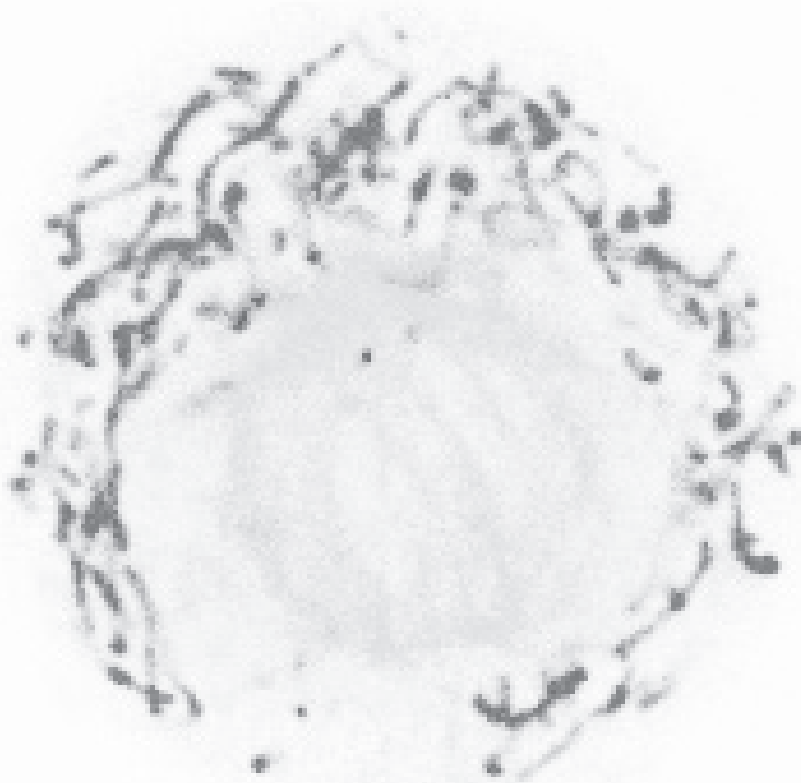
En la actualidad existe una necesidad importante de formas nuevas y eficaces de terapias sistémicas. En la validación y selección de dianas moleculares y patrones para la intervención terapéutica en cáncer, la frecuencia con la que una diana particular o un patrón se encuentran mutados o alterado es un indicador de su importancia en el proceso de malignificación y de su uso potencial como diana de una droga para el tratamiento contra el cáncer.

La mitocondria juega un papel muy importante, como se ha descrito anteriormente, en el proceso de carcinogénesis. Se han descrito diferencias en la estructura y función de las mitocondrias entre células normales y cancerígenas, incluyendo diferencias en su actividad metabólica, composición molecular y en la secuencia del mtDNA. Estas diferencias en las células cancerígenas hacen que puedan servir no sólo como marcador para una detección temprana, sino también como una diana para nuevas terapias específicas (Modica-Napolitano y Singh, 2002). De este modo, se ha trabajado en estrategias quimioterápicas que utilizan cationes lipofílicos que se acumulan selectivamente en células cancerígenas con un elevado potencial de membrana mitocondrial (Anderson y cols., 1993; Modica-Napolitano y cols., 1996). Otras estrategias alternativas son el empleo de la maquinaria de importación de proteínas para dirigir moléculas a la mitocondria (Ellerby y cols., 1999) o favorecer la permeabilización mitocondrial mediante el uso de drogas que interaccionan específicamente con proteínas de la membrana mitocondrial e inducir en último término la apoptosis (Robertson y Orrenius, 2000; Han y cols., 2001b).

Las células cancerígenas generalmente exhiben una incrementada glucólisis. Por ello, se están estudiando terapias que inhiben la glucólisis, puesto que las células tumorales serán más sensibles que las células normales con mitocondrias funcionales que son capaces de usar fuentes de energía alternativas para producir ATP a través de la respiración (Pelicano y cols., 2006; Pan y Mak, 2007). La depleción de ATP celular genera principalmente muerte por necrosis (Leist y cols., 1997). Pero también se ha observado que una disminución severa de la glucólisis elimina el ATP de las células cancerígenas y permite una rápida defosforilación de Bad, una reorganización de Bax en la membrana mitocondrial y una masiva muerte celular por apoptosis (Xu y cols., 2005). Una ventaja añadida a este tipo

de terapias es que la depleción de ATP celular por la inhibición de la glucólisis parece ser efectiva en matar células con fenotipo MDR (*Multi-Drug Resistance*) ya que requieren de ATP como fuente de energía para bombear las drogas fuera de la célula (Cole y cols., 1992; Tan y cols., 2000).

Existen numerosos compuestos que presentan actividad como inhibidores de la generación de ATP a través de la ruta glucolítica. 2-deoxiglucosa es un análogo no metabolizable de la glucosa, que bloquean el paso inicial de la glucólisis de conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato (Ko y cols., 2001; Geschwind y cols., 2004). La inhibición de este paso causa la depleción de ATP celular, originando la parada del ciclo celular e inducción de muerte *in vitro* (Maher y cols., 2004), y exhibe actividad antitumoral *in vivo* (Maschek y cols., 2004). Sin embargo, la efectividad de 2-deoxiglucosa se encuentra significativamente afectada por la presencia de su competidor natural, la glucosa, y parece que sólo reduce parcialmente la disponibilidad de la glucosa para la glucólisis (Geschwind y cols., 2004). Otro compuesto que actúa al mismo nivel es 3-bromopiruvato (3BrPA), un potente inhibidor de hexoquinasa II (Ko y cols., 2001). 3BrPa inhibe la producción de ATP mediante la inhibición de la glucólisis y la fosforilación oxidativa (Ko y cols., 2001; Geschwind y cols., 2004). La administración intra-arterial directa de este agente alquilante en tumores de hígado reduce el tamaño de la masa tumoral hasta eliminarla (Geschwind y cols., 2002; Ko y cols., 2004). Además, los efectos tóxicos sobre otros órganos son mínimos, lo que permite pensar en la efectividad de esta terapia para el tratamiento del cáncer de hígado (Geschwind y cols., 2002; Ko y cols., 2004). Estudios más recientes proponen la molécula de dicloroacetato (DCA) como nuevo agente terapéutico contra el cáncer (Pan y Mak, 2007; Bonnet y cols., 2007). DCA inhibe la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) produciendo un cambio metabólico en la célula, inhibiendo la glucólisis y activando por el contrario la fosforilación oxidativa (Bonnet y cols., 2007). Esto ocasiona una disminución de $\Delta\psi_m$, un aumento de los niveles de H_2O_2 y una activación de los canales de potasio, lo que en su conjunto origina una inducción de la apoptosis y una disminución del crecimiento del tumor (Bonnet y cols., 2007). Estos efectos no son observados en las células normales que rodean al tumor debido a que en ellas no se produce ningún cambio metabólico (Bonnet y cols., 2007).



OBJETIVOS

En los últimos años se ha comprobado que el mal funcionamiento de la mitocondria está relacionado con la generación y/o progresión de un gran número de enfermedades, incluyendo el cáncer. La importancia de la mitocondria en el campo del cáncer ha sido promovida, principalmente, por dos hechos: (i) la constatación de que el metabolismo energético está molecular y funcionalmente integrado con la capacidad de la mitocondria para la ejecución de la muerte celular y (ii) la implementación de técnicas de imagen por tomografía de emisión de positrones (PET) mediante la captura celular de ^{18}F FDG para el diagnóstico y el estadiaje de los tumores en clínica. Esta técnica en realidad supone la traslación de la hipótesis de Warburg al ámbito clínico. Es decir, se basa en que la mayor captación de glucosa por la célula tumoral en condiciones de aerobiosis se debe a un fallo de la función bioenergética de la mitocondria.

Con estos antecedentes, en esta tesis nos propusimos contribuir al esclarecimiento de la participación de la mitocondria en la biología del cáncer con los siguientes objetivos:

- 1- Análisis de la “huella bioenergética” (proteoma del metabolismo energético) en distintas neoplasias (esófago, próstata y melanoma), así como del estudio de la posible relevancia de la “huella bioenergética” para el pronóstico de pacientes con melanoma.
- 2- Estudio del efecto de diferentes oncogenes sobre la “huella bioenergética” y metabolismo energético de la célula.
- 3- Estudio de la contribución de la H^+ -ATP sintasa en el proceso de progresión tumoral mediante la caracterización de su mecanismo de participación en muerte celular.
- 4- Caracterización de la biogénesis y dinámica de la mitocondria durante la proliferación celular.

Recientemente, varios estudios han sugerido la existencia de una expresión ectópica de la H^+ -ATP sintasa en la membrana plasmática de distintos tipos celulares. Dada la implicación que estos resultados pueden tener en campos muy diversos, incluido el cáncer, nos propusimos un objetivo adicional:

- 5- Estudio de la posible expresión ectópica de $\beta\text{-F}_1\text{-ATPasa}$ en la membrana plasmática de la célula.



MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Muestras humanas.

3.1.1.1. Muestras de melanomas y características clínico patológicas de los pacientes.

Un total de 75 muestras de tejido de nevus comunes (n=21), melanomas malignos (n=41) y metástasis de melanomas (n=13) se obtuvieron del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Las muestras se recopilaron durante un periodo de cuatro años (1989-2003). Se revisaron los informes médicos y se asignó un código por paciente para proteger la confidencialidad de los mismos. Se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina para revisar en todos los casos la medida de los índices de Breslow de los pacientes. Se definió la fase de progresión histológica de acuerdo con el criterio estándar (Breslow, 1970; Clark y cols., 1989) por los patólogos. Las secciones de tejido de cada paciente se obtuvieron ajustándose a las normas éticas establecidas a estos efectos.

3.1.1.2. Muestras de carcinomas de próstata y esófago.

Las muestras de biopsias de carcinomas de próstata y esófago se obtuvieron del Banco de Tejidos y Tumores, IDIBAPS, del Hospital Clinic de Barcelona. Las secciones de tejido tumoral y normal de cada paciente se obtuvieron ajustándose a las normas éticas establecidas a estos efectos.

3.1.2. Líneas celulares.

Las líneas celulares **C9** (*Clone 9*), derivada de hígado normal de rata adulta, **HMEC-1** (*Human Microvascular Endothelial Cell line*) derivada de endotelio humano, **HepG2**, derivada de hepatocarcinoma humano, **A549**, derivada de carcinoma humano de pulmón, **SV7tert** derivada de angiomiolipoma humano y líneas derivadas de esta última (**SV7tertPDGF**, **SV7tertPDGF tumor1 y tumor2**), se cultivaron en DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS).

Las líneas celulares **WM35** y **WM35PKB**, derivadas de melanoma radial humano y las líneas **LG2BT** y **LG2AT**, líneas celulares linfoblastoides, se cultivaron con medio RPMI suplementado con 10% suero fetal bovino.

Las líneas celulares **L10BIOBRGFP** y **L10BIOBR Ras**, derivadas de melanocitos murinos, se cultivaron en medio Ham's F10 suplementado con 10% suero fetal bovino.

Todos los medios se complementaron con 2 mM glutamina, 100 UI/ml penicilina, 0,1 mg/ml estreptomycin y 400 μ M de aminoácidos no esenciales (Ala, Asn, Asp, Glu y Pro). Todas las líneas celulares se mantuvieron en incubadores a 37°C con 7% CO₂ y un 95% de humedad.

3.1.3. Animales de experimentación.

Se emplearon ratas albinas de raza *Wistar* de peso comprendido entre 200 y 300g. Los animales se criaron en el animalario del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" en celdas estancas dotadas de ventilación y ciclos de luz oscuridad. Los animales tuvieron en todo momento libre acceso al agua y a la dieta estándar del laboratorio (23% proteínas, 5%

lípidos, 40,8% glúcidos, 4% celulosa, 5,7% sales minerales, 12% agua y vitaminas). La humedad osciló entre el 40-50% y la temperatura entre 22-24°C.

3.1.4. Cepas bacterianas

Para mantener, crecer y purificar DNA plasmídico se ha empleado la cepa bacteriana DH5 α , de *Escherichia coli*. El cultivo de esta cepa se efectuó en medio Luria-Bertani (LB) (1% (p/v) bactotriptona, 0,5% (p/v) extracto de levadura y 1% (p/v) NaCl) suplementado y dependiendo de cada caso con Ampicilina (50 μ g/ml) o Kanamicina (30 μ g/ml).

3.1.5. Plásmidos usados en este trabajo.

Los plásmidos CDL-GFP- β -3'-UTR y CDL-GFP-Tfam-3'-UTR, que expresan RNA quimeras de la proteína verde fluorescente (gfp) con la región 3' no traducible (3'UTR) de los mensajeros de β -F₁-ATPasa y Tfam respectivamente, se obtuvieron como se describe en Di Liegro y cols., 2000. Estas construcciones se usaron para obtener las construcciones p β -GFP- β -3'-UTR y p β -GFP-Tfam-3'-UTR clonando la presecuencia del mensajero de β -F₁-ATPasa que dirige la proteína a la mitocondria.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Obtención de líneas celulares estables.

3.2.1.1. Transfección de plásmidos recombinantes en células en cultivo.

La transfección de plásmidos recombinantes en células en cultivo se llevó a cabo utilizando el reactivo FuGENE™ 6 (Roche). El reactivo se mezcla en una relación 2:1 (μ l FuGENE: μ g DNA) con los plásmidos a transfectar. Para ello, primero se diluye el volumen de FuGENE correspondiente en 100 μ l de DMEM sin suero y se incuba 5 min a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de FuGENE se añade gota a gota sobre la solución de DNA plasmídico (a una concentración comprendida entre 0,02-2,0 μ g/ μ l) y se incuba durante 15 min a temperatura ambiente. Por último la mezcla de FuGENE y DNA se añade gota a gota sobre el medio de la monocapa de células a un 60% de confluencia.

3.2.1.2. Obtención de clones positivos.

La selección de células positivas se llevó a cabo 24 horas después de la transfección con 40 μ g de geneticina (G418) (GIBCO) durante varios días. Los clones positivos así obtenidos se subclonaron con anillos de clonaje (8x8 mm) (Sigma) aprovechando la fluorescencia intrínseca de las células positivas. La pureza de las poblaciones derivadas de cada clon se analizó por citometría de flujo.

3.2.2. Sincronización celular.

La parada del ciclo celular se llevó a cabo mediante doble bloqueo metabólico con timidina permitiendo que las células queden sincronizadas en la frontera de las fases G₁/S del ciclo celular. Con este objeto, cultivos subconfluentes de células C9 (4x10⁵ células en placas de 100mm de diámetro) se trataron con medio que contiene timidina 2mM durante 10 horas. A continuación se lavó la monocapa de células dos veces con DMEM y se añadió medio que contenía deoxicitidina 24 μ M. Seis horas después se impuso un nuevo bloqueo

añadiendo timidina a una concentración final 2mM y a las 10 horas se liberó del mismo

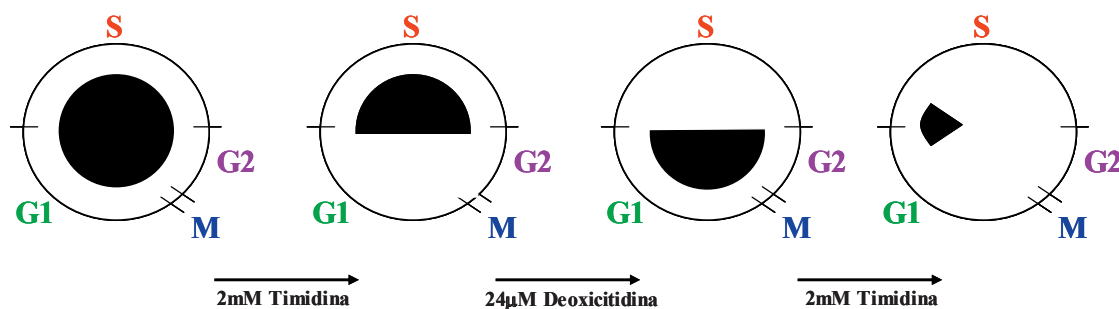


Figura 3.1. Esquema del protocolo de sincronización.

lavando y añadiendo medio con deoxicitidina 24µM (Figura 3.1).

3.2.3. Extracción de proteínas.

3.2.3.1. Extracción de proteína total a partir de biopsias de tejido humano.

Los extractos celulares se obtuvieron a partir de las biopsias congeladas de los tejidos previamente informados por el patólogo. Para ello, 15-20 cortes de 17 µm se trataron con 300 µl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,02% azida sódica, 0,1% SDS, 1% Nonidet P-40, 0,5% desoxicolato sódico, aprotinina 100 µg/ml, leupeptina 100 µg/ml, 40 mM EDTA, 1M NaF y 30 mM PMSF). Las muestras resuspendidas en el tampón de lisis se mantuvieron durante 20 min a 0°C. Transcurrido este tiempo se centrifugaron a 9000xg durante 25 min a 4°C. Los sobrenadantes se conservaron en pequeñas alícuotas a -70°C hasta su correspondiente análisis.

3.2.3.2. Fraccionamiento y obtención de extractos proteicos de hígado de rata.

3.2.3.2.1. Obtención de homogenizados post-nucleares.

Las muestras de hígado se homogenizaron en una relación 1:4 (p/v) en medio A (Tris- HCl 20mM pH 7,4, sacarosa 250 mM, EGTA 1mM) que contenía PMSF 100µM, benzamidina 100µM, leupeptina 10µg/ml, pepstatina A 5µg/ml y aprotinina 17µg/ml, mediante 5 pases del émbolo A y 3 pases del B de un homogenizador Dounce vidrio-vidrio. Los homogenizados se centrifugaron a 800xg a 4°C durante 10 minutos para eliminar los núcleos y células no rotas, el sobrenadante corresponde a la fracción post- nuclear.

3.2.3.2.2. Aislamiento de mitocondrias mediante gradientes de sacarosa.

Las mitocondrias se obtuvieron a partir de 3 ml de extracto post-nuclear mediante centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa del 24 al 54 % (p/p) en Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a 145.000xg durante 70 minutos a 4°C. Los gradientes se fraccionaron desde el fondo del tubo en fracciones de 2 ml. La localización de la fracción mitocondrial se hizo mediante *Western-blot* usando anticuerpos específicos contra marcadores mitocondriales (β -F₁-ATPasa y Hsp 60). La fracción con mayor concentración de mitocondrias se diluyó con medio A hasta que la concentración final de sacarosa fue de 250 mM. A continuación, se centrifugó a 8.000xg durante 10 minutos a 4°C y el sedimento se resuspendió en el

mínimo volumen de medio A.

3.2.3.2.3. *Aislamiento de membranas plasmáticas mediante gradientes de sacarosa.*

La fracción post-nuclear se centrifugó a 180.000xg, el sobrenadante corresponde a la fracción post-ribosomal. Las membranas se obtuvieron a partir del sedimento de la anterior centrifugación, previamente homogenizado mediante dos pases de émbolo en sacarosa 57% en Tris 10 mM pH 7,5, por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa del 34 al 57% (p/p) en Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a 25.000rpm durante 16 horas a 4°C. Los gradientes se fraccionaron desde el fondo del tubo en fracciones de 2 ml. La localización de la fracción que contenía membrana plasmática se hizo mediante *Western-blot* usando anticuerpos específicos contra marcadores de membrana (β -catenina y E-cadherina). La fracción con mayor concentración de membrana plasmática se diluyó con medio A hasta que la concentración final de sacarosa fue de 250 mM. Luego, se centrifugó a 180.000xg durante 70 minutos a 4°C y el sedimento se resuspendió en el mínimo volumen de medio A.

3.2.3.3. Extracción de proteína total a partir de cultivos celulares.

Las células se lavaron dos veces con PBS y se despegaron de la placa mediante tripsinización con una solución 0,25% Tripsina-0,02% EDTA. Posteriormente, se añadió el medio de cultivo correspondiente suplementado con 10% de suero fetal para detener la tripsinización. De esta forma se obtuvo una suspensión de células que se centrifugó a 500xg durante 5 min y a 4°C, se lavó con PBS y se volvió a centrifugar. A continuación, el sedimento de células obtenido se resuspendió en 100 μ l del tampón de lisis (Tris 10mM pH 7,5, NaCl 130 mM y Tritón X-100 al 0,5%). Los tubos se agitaron y se mantuvieron a 4°C durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron en frío durante 10 min a 15000xg. Del sobrenadante, en el que se encontraban las proteínas, se hicieron alícuotas que fueron almacenadas a -70°C.

3.2.4. Fraccionamiento electroforético de proteínas.

3.2.4.1. PAGE-SDS.

Las proteínas se fraccionaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). La calibración de los geles se efectuó mediante electroforesis en paralelo de un conjunto de proteínas de peso molecular conocido: 200, 97, 66, 45, 30, 21.5, y 14.3 kDa (Rainbow mix RPN 756, Amersham).

3.2.4.2. Electroforesis bidimensional.

El análisis de proteínas en dos dimensiones (2D) se llevó a cabo empleando el *Immobiline DryStrip Kit* desarrollado por Görg y col. (2000) y suministrado por Pharmacia-LKB de acuerdo a las instrucciones del proveedor y con algunas modificaciones introducidas en nuestro laboratorio (Flores y Cuezva, 1997). Para la primera dimensión se emplearon los geles deshidratados *Immobiline DryStrip* de 110 x 3 mm y 0,5 mm de grosor que contienen un gradiente de pH inmovilizado en el rango de 4-7. Estos geles se rehidrataron en urea 8

M, tritón X-100 0,5%, DTT 1,3 mM y Pharmalyte 3-10 0,005% (v/v), antes de la aplicación de las muestras. El isoelectroenfoque, siempre a una temperatura constante de 20°C, se llevó a cabo a 300 V durante 1 hora y a 1400 V durante 17 horas. Una vez finalizada la primera dimensión, los geles se congelaron a -70°C hasta su uso. Para la realización de la segunda dimensión, los geles se descongelaron y equilibraron durante 15 min en cada uno de los siguientes medios: i) 25-100 mg de DTT por cada 10 ml de solución: Tris-HCl 50 mM pH 6,8, urea 6M, glicerol 26% y SDS 1%; ii) 0,45 g de yodoacetamida por cada 10 ml de la misma solución descrita anteriormente. Posteriormente, los geles se cargaron sobre geles de policacrilamida del 12,5% de 14x13 cm y 0,75 mm de espesor. La segunda dimensión se llevó a cabo como se describe en el apartado anterior.

3.2.4.3. Tinción de las proteínas fraccionadas.

Las proteínas fraccionadas en geles mono- o bidimensionales se fijaron con una solución de ácido acético al 10% (v/v) e isopropanol al 25% (v/v) durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se tiñeron con una solución de Azul Brillante de Coomassie R-250 al 0,25% (p/v) en metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 7% (v/v) durante 2-8 horas. La eliminación del exceso de colorante no unido a proteína se realizó mediante difusión de éste en una solución de ácido acético al 10% (v/v) y metanol al 25% (v/v).

3.2.4.4. Detección inmunológica de proteínas (*Western-blot*).

Las proteínas fraccionadas en geles mono- o bidimensionales se transfirieron a membranas de PVDF (0,45 µm de poro) mediante electro-transferencia semiseca o húmeda. Para la transferencia semiseca se utilizó un equipo de Pharmacia-LKB empleando una intensidad de corriente de 1 mA/cm² de superficie de gel y en tampón de transferencia (Glicina 39 mM, Tris-HCl 48 mM, metanol 20% (v/v) y 0,0375% SDS) durante 90 min a temperatura ambiente. Para la transferencia húmeda se utilizó un equipo Mini Trans Blot® de Bio-Rad y en el mismo tampón de transferencia pero sin SDS. En este caso la transferencia se efectuó a 100V durante 45 min. A continuación, las membranas se bloquearon con leche desnatada liofilizada al 5% (p/v) diluida en TBS (NaCl 0,15 M, Tris-HCl 10 mM pH 7,5) más 0,1% Tween-20 durante al menos 1 hora con agitación y a temperatura ambiente. La incubación de la membrana con el anticuerpo se efectuó a temperatura ambiente durante 1 hora o a 4°C durante toda la noche, dependiendo del anticuerpo. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-gfp (Clontech, 1:1000), anti-α-tubulina (Sigma, 1:1000), anti-Hsp60 (Stressgene, 1:3000), anti-β-F1-ATPasa (Ab1) (Molecular Probes, 1:1000), anti-β-F1-ATPasa (Ab2) ((Cuezva y cols., 2002), 1:5000), anti-β-F1-ATPasa (Ab3) ((Ricart y cols., 2002), 1:1000), anti-β-F1-ATPasa (Ab4) (1:5000), anti-COXI (Molecular Probes, 1:250), anti-COXIV (Molecular Probes, 1:100), anti-GAPDH (Abcam, 1:20000), anti-PK (Abcam, 1:1000), anti-AMPK y anti-p-AMPK (Cell Signalling, 1:1000), anti-ciclina B1 (Santa Cruz, 1:100) y anti-E-cadherina (BD Pharmigen, 1:1000). Los anticuerpos se diluyeron en TBS más albúmina bovina al 3%. A continuación, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min con TBS-Tween (0,1%). Posteriormente, las membranas se incubaron con

un anticuerpo secundario de cabra contra la región Fc de las IgGs de conejo, o de un anticuerpo de conejo contra la región Fc de las IgGs de ratón o de cabra, dependiendo del anticuerpo primario utilizado, conjugados a peroxidasa (Nordic Immunology, 1:3000), en solución de bloqueo. Las proteínas inmunorreactivas se visualizaron utilizando el método quimioluminiscente del ECLTM (Amershan) según las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la intensidad de las bandas resultantes que estaban dentro del rango lineal de la película se determinó utilizando el software Kodak Digital Science 1D.

3.2.5. Tinción de proteínas y análisis mediante citometría de flujo.

3.2.5.1. Tinción de proteínas de membrana.

Las células se lavaron dos veces con PBS y se despegaron de la placa mediante tripsinización con una solución 0,25% Tripsina-0,02% EDTA. Posteriormente, se añadió el medio de cultivo correspondiente suplementado con 10% de suero fetal para detener la tripsinización. De esta forma se obtuvo una suspensión de células que se distribuyó en pocillos de una placa p96 de forma que hubiera 50000 células por pocillo y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 3% ó 1% en PBS durante 30 minutos. A continuación, se lavó el pellet con solución de tinción (PBS 1x que contiene: 1% FBS, 1% albúmina bovina y 0,01% de NaN₃) y se centrifugó de nuevo. Las células se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario, en un volumen final de 50 µl en solución de tinción, durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, se lavaron de nuevo 2 veces las células y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo Alexa 488 durante 20 minutos a 4°C y en la oscuridad. Se lavaron de nuevo las células y se resuspendieron en 500 µl de solución de tinción.

3.2.5.2. Tinción de proteínas intracitoplasmáticas.

En el caso de tinción intracitoplasmática las células se fijaron previamente con 2% de paraformaldehído durante 30 minutos y se permeabilizaron con solución de tinción más 0,2% de saponina. A continuación, se procedió de igual forma que con la tinción de proteínas de membrana añadiendo siempre 0,2% de saponina a la solución de tinción.

Para estudiar el contenido de proteínas en las diferentes fases del ciclo celular las células se incubaron al terminar la tinción con RNasa A a una concentración final de 100 µg/ml y yoduro de propidio a una concentración final de 5 µg/ml durante 30 minutos a 37°C.

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA) utilizando el programa CellQuest suministrado por el fabricante. En cada condición se analizaron al menos 10.000 células.

3.2.6. Estudio del contenido de gfp en el ciclo celular.

Para el análisis de expresión de gfp a lo largo del ciclo celular las células C9-pβGFP3'β and C9-pβGFP3'Tfam se fijaron con 0,2% de paraformaldehído en PBS durante 5 minutos y se lavaron con una solución fría de etanol al 70%. A continuación, las células se incubaron con RNasa A a una concentración final de 100 µg/ml y yoduro de propidio a una concentración final de 25 µg/ml durante 30 minutos a 37°C. Las muestras se analizaron

en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA) utilizando el programa CellQuest suministrado por el fabricante. En cada condición se analizaron al menos 10.000 células.

3.2.7. Análisis de la expresión de proteínas en el ciclo celular mediante “sorting”.

Para la separación de células en fases G_0/G_1 , S y G_2/M , células C9 al 70% de confluencia se tiñeron con 5 $\mu\text{g/ml}$ Hoescht 33342 (Molecular Probes) en medio de cultivo durante 10 minutos a 37°C y protegidas de la luz. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS y se despegaron de la placa mediante tripsinización con una solución 0,25% Tripsina-0,02% EDTA y se resuspendieron en PBS con 5mM EDTA, 25mM HEPES pH7.0 a una concentración aproximada de 5×10^6 células/ml. Con el fin de eliminar agregados, la suspensión de células se filtró a través de un poro de filtro de 0,7 μm . Las células se separaron entonces en un FACSCVantageSE (BD Biosciences, Erembodegen, Belgium) de acuerdo con su contenido de DNA definiendo tres regiones correspondientes a las fases del ciclo celular G_0/G_1 , S y G_2/M y recogidas en tubos estériles de 0,5ml que contenían FBS. La pureza de cada fracción se determinó mediante tinción con yoduro de propidio en células fijadas.

3.2.8. Aislamiento de RNA a partir de células en cultivo y análisis por *Northern-blot*.

El RNA total de las células se obtuvo utilizando el reactivo TriPure® (Roche), según el protocolo suministrado por la casa comercial. Tras resuspender el RNA en un volumen adecuado de agua libre de RNAsas, se incubó 5 min a 65°C y se mide su concentración mediante la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, siendo la relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ superior a 1,8.

Para el análisis por *Northern blot* se separaron ~30 μg de RNA total mediante electroforesis en geles de 1,4% agarosa-formaldehído. El RNA desnaturalizado se transfirió a membranas de nylon (GeneScreen™) mediante vacío y se fijó a las membranas a 80°C. Posteriormente, las membranas se pre-hibridaron durante 2 horas en un medio que contiene: 50% formamida, PIPES 20 mM, NaCl 800mM, EDTA 2mM, 0,5% SDS y 100 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de esperma de salmón, para ser luego hibridadas con los distintos cDNAs marcados con [^{32}P] en el mismo medio durante la noche a 42 °C. Tras la hibridación, las membranas se lavaron durante 10 min a temperatura ambiente con 6xSSC (SSC 1x es NaCl 150 mM y citrato sódico 15 mM), 10 min a 65°C con 2xSSC + 0,1% SDS y, en caso de necesitar otro lavado, 10 min a 65°C con 0,1xSSC + 0,1% SDS. Todas las membranas se expusieron a películas radiográficas AGFA (x-ray Film RP-2) a -70°C durante distintos tiempos con pantallas de tungsteno (Dupont Cronex Lighting Plus XL). Las membranas se deshibridaron durante 15 min a 95°C en agua estéril para, posteriormente, y tras ser comprobada la ausencia de señal de las sondas empleadas, poder ser re-hibridadas frente a otra sonda según lo descrito anteriormente. La cuantificación de la intensidad de las bandas resultantes que estaban dentro del rango lineal de la película se determinó utilizando el programa Kodak Digital

Science 1D, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.9. Aislamiento de DNA a partir de células en cultivo y análisis por *Southern-blot*.

El DNA total de las células se obtuvo mediante una extracción fenólica y digestión con RNasa A y proteinasa K. El DNA así aislado se digirió durante una noche con la endonucleasa BamHI. Para el análisis por *Southern-blot*, los fragmentos de DNA se resolvieron en un gel de agarosa al 0,8% , se transfirieron a membranas de nylon (GeneScreen™) mediante vacío y se fijaron a las membranas con dos ciclos de entrelazado “*autocrosslinking*” (120.000μJ/ciclo) en un Stratalinker (Stratagene) con la membrana todavía húmeda. Posteriormente, las membranas se prehibridaron durante 2 horas en medio de prehibridación (10x Denhardt (0,2% Ficoll-400, 0,2% PVP y 0,2% BSA), 1% SDS, 6xSSC (SSC 1x es NaCl 150 mM y citrato sódico 15 mM) y 0,132μg/ml de DNA de esperma de salmón (ssDNA)) para ser luego hibridadas con los distintos cDNAs marcados con [³²P] en el medio de hibridación (50% formamida, 1%SDS, 6xSSC y 0,06μg ssDNA) durante la noche a 42 °C. Tras la hibridación, las membranas se lavaron durante 10 min a temperatura ambiente con 6xSSC, 10 min a 65°C con 2xSSC + 0,1% SDS y, en caso de necesitar otro lavado, 10 min a 65°C con 0,1xSSC + 0,1% SDS. Todas las membranas se expusieron a películas radiográficas AGFA (x-ray Film RP-2) a -70°C durante distintos tiempos con pantallas de tungsteno (Dupont Cronex Lighting Plus XL).

3.2.10. Obtención de sondas marcadas radiactivamente de DNA.

Los plásmidos empleados para la obtención de sondas han sido:

-pJMI-β-F1, digerido con Kpn I y Hind III o EcoR I y Apa I para generar las sondas correspondientes al mensajero completo o sin la región 3'-UTR de β-F₁-ATPasa, respectivamente.

-pEGFP-C2, digerido con EcoR I y Eco47 III para generar la sonda de gfp.

-p12S, digerido con EcoR I y Hind III para generar una sonda correspondiente a un fragmento del rRNA 12S.

-pATPasa 6-8, digerido con BamH I y Hind I para generar una sonda de ATPasa 6-8.

En el caso de 18S se utilizó un oligonucleótido específico de dicha secuencia.

3.2.10.1 Marcaje radiactivo de sondas de DNA.

El marcaje radiactivo de las sondas de DNA se llevó a cabo mediante el método de *nick-translation* (Rigby y cols., 1977) utilizando 100 ng de DNA procedente de digestiones purificadas mediante el método del GeneClean y 50 μCi de [α-³²P]-dCTP (3.000 Ci/mmol). Los oligonucleótidos se marcaron mediante adición de un grupo fosfato radiactivo en su extremo 5' empleando la enzima polinucleótido quinasa con 30μCi de [γ-³²P]-dCTP (3.000 Ci/mmol) (Sambrook y cols., 1989). Los nucleótidos no incorporados se separaron en una columna de centrifugación de Sephadex G-50, siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y cols., 1989. En todos los casos se determinó la actividad específica de cada sonda siendo siempre superior a 10⁸ c.p.m./μg de DNA.

3.2.11. Técnicas de inmunomarcaje.

3.2.11.1. Inmunofluorescencia.

Para la detección y localización subcelular de distintas proteínas se realizaron inmunofluorescencias con anticuerpos secundarios acoplados a distintos fluorocromos. Antes de la realización del protocolo de inmunofluorescencia, las células crecidas sobre cubreobjetos se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% ó 2% en PBS. Posteriormente, las células ya fijadas se sometieron al tratamiento con NaBH_4 1mg/ml en PBS pH 8,0 (recién preparada) durante 10 min y a temperatura ambiente, con objeto de eliminar la autofluorescencia celular. A continuación, se trataron los cubres durante 10 minutos con una solución de PBS / 0,1% Tritón X-100 a temperatura ambiente para permeabilizar las células. Posteriormente, se incubaron otros 10 min con una solución de bloqueo (1% FBS en PBS 1x más 0,1% Tritón X-100). La incubación con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en la misma solución de bloqueo, se realizó durante 1 h a temperatura ambiente. Es importante centrifugar previamente la dilución del anticuerpo 5 minutos a 12.000xg en una microfuga a 4°C para eliminar agregados y reducir fondo. Los anticuerpos utilizados fueron: anti- α -tubulina (Sigma, 1:200), anti- β -actina (Sigma, 1:200), anti-citocromo c (BD Pharmigen, 1:1000), anti- β -F₁-ATPasa ((Cuezva y cols., 2002), 1:100), anti- β -F₁-ATPasa (Molecular Probes, 1:500), anti- α -F₁-ATPasa (Molecular Probes, 1:500) y anti- β -catenina (BD, Pharmigen, 1:100). A continuación, las células se lavaron sumergiéndolas 3 veces en PBS y se incubaron 45 minutos, en oscuridad y a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario correspondiente. En este caso también es recomendable centrifugar previamente la solución con el anticuerpo 5 minutos a 12.000xg en una microfuga a 4°C. A continuación, el lavado de las células se llevó a cabo sumergiendo los cubres 3 veces en PBS, una en agua destilada y una en etanol absoluto, secando en todos los casos el exceso de líquido sobre papel. Inmediatamente después los cubreobjetos con las células boca-abajo se montaron sobre portaobjetos con una gota de medio de montaje (Mowiol/DABCO). Todas las inmunofluorescencias se observaron y fotografiaron en un microscopio Confocal Radiance2000, equipado con 3 láseres, acoplado a un microscopio invertido Axiovert S100 TV (Zeiss), utilizando el programa LaserSharp 2000.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los correspondientes a los anticuerpos primarios monoclonales o policlonales, acoplados al fluoróforo Alexa 594 (Molecular Probes) que es capaz de emitir fluorescencia roja a una longitud de onda de 617 nm al ser excitado a un longitud de onda de 590 nm o Alexa 488 (Molecular Probes) que emite fluorescencia verde a una longitud de onda de 519 nm al ser excitado a un longitud de onda de 495 nm. En todos los casos los anticuerpos secundarios se utilizaron a una dilución 1:1000.

Para detectar el DNA nuclear de las células, en las inmunofluorescencias se utilizó la sonda To-PRO-3 (Molecular Probes, 1:2500) que se diluye con el anticuerpo secundario, y cuya fluorescencia azul es fácilmente detectable y distinguible de las demás, al emitir a una

longitud de onda de 661 nm cuando es excitada a una longitud de onda de 642 nm.

Si las proteínas a detectar se encuentran en membrana plasmática el procedimiento es prácticamente similar, eliminando el paso de permeabilización y utilizando las soluciones de bloqueo y de incubación de anticuerpos sin Triton X-100.

3.2.11.2. Inmunomicroscopía electrónica.

3.2.11.2.1. *Criosustitución e inclusión en Lowicryl.*

Las muestras de tejido de hígado se fijaron mediante inmersión de pequeños trozos ($\sim 1\text{mm}^3$) en 4% de paraformaldehído (Merck, Alemania) en tampón fosfato Sörensen 0,1M pH 7,2 suplementado con 6% sacarosa durante 2 horas a 4°C, siendo conservados hasta su inclusión en 0,1% paraformaldehído en tampón fosfato 0,1M pH 7,2 y 6% sacarosa, a 4°C (Egea y cols., 1997; Flores y Cuezva, 1997). Posteriormente, se deshidrataron a temperaturas descendentes en concentraciones crecientes de metanol. Las líneas celulares se fijaron siguiendo el mismo protocolo usado para el tejido de hígado y posteriormente fueron crioprotegidas utilizando concentraciones crecientes (0,1-2,3 M) de sacarosa. A continuación, se criofijaron en nitrógeno líquido y se criosustituyeron en metanol a -80°C. Todas las muestras se embebieron en Lowicryl K4M (Chemische Werke Lowi, Waldkraiburg, Alemania) según el protocolo descrito por la casa comercial.

3.2.11.2.2. *Obtención de criosecciones ultrafinas.*

Las células se fijaron en 4% de paraformaldehído más 0,1% de glutaraldehído en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las células se incluyeron en gelatina al 2% durante 2 horas en hielo y se hicieron cuadrados de aproximadamente $0,5\text{ mm}^3$. Las muestras se crioprotegieron durante toda la noche a 4°C en sacarosa 2,3M. Una vez criofijadas en nitrógeno líquido, se obtubieron criosecciones ultrafinas, de 70-80 nm de espesor, a -120°C en ultramicrotomo LeicaUCT (Leica Microsystems). Los cortes se recogen con un loop en metilcelulosa 2% en agua:sacarosa 2,3M (1:1).

3.2.11.2.3. *Inmunomarcaje.*

El inmunomarcaje se llevó a cabo sobre cortes en rejillas de cada una de las muestras con el siguiente protocolo: tras bloquear con 1% BSA en PBS durante 5 min se incubó con el primer anticuerpo diluido en medio de bloqueo durante 1h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, se incubó durante 1h con 0,08 unidades de absorbancia a 525 nm del complejo proteína A-oro coloidal de menor tamaño (10 nm) diluido en PBS suplementado con 1% BSA, 0,075% Tritón X-100, 0,075% Tween 20 y 0,02% azida sódica durante 45 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Tras lavar el exceso de anticuerpo se incubó 30 min con 0,1 mg/ml de proteína A en PBS para saturar los sitios de unión del primer anticuerpo a la proteína A. Por último, las muestras se fijaron con 1% glutaraldehído en PBS y se contrastó 7 min con acetato de uranilo y 45 s con citrato de plomo. En paralelo se realizaron una serie de controles clásicos para comprobar la especificidad de la señal inmunorreactiva. Las muestras se observaron en un microscopio

JEOL 1010 (Japón) a 80 KV. Los anticuerpos utilizados fueron: anti- β -F₁-ATPasa (Cuezva y cols., 2002, 1:50), anti- β -F₁-ATPasa (Molecular Probes, 1:100), anti-Hsp60 (Stressgene, 1/25), anti-gfp (Clontech, 1:100) y anti-endoglina (1/2).

Las técnicas de inclusión, corte, procesamiento y fotografiado de las muestras analizadas por inmunomicroscopía electrónica fueron realizadas por el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”.

3.2.11.3. Inmunohistoquímica

Secciones de 5 μ m se obtuvieron de bloques de parafina fijados con formalina. En el caso específico de melanomas, los bloques de parafina incluyen además del tumor tejido adyacente donde se puede encontrar glándulas sudoríparas que se utilizaron para normalizar las cuantificaciones de los melanomas. Las secciones se desparafinaron y la actividad endógena peroxidasa se inhibió por incubación de las muestras en 3% H₂O₂ en metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los antígenos se recuperaron mediante la incubación de los cortes en EDTA durante 45 minutos a 155°C. Los anticuerpos que se usaron para la inmunodetección fueron: anti- β -F₁-ATPasa ((Cuezva y cols., 2002), 1:3000), anti-Hsp60 (Stressgene, 1:400), anti-GADPH (Abcam, 1:8000), anti HK-III (Sigma, 1:8000) y anti-PK (Abcam, 1:2000). Los anticuerpos se diluyeron en 1% BSA en TBS y los cortes de tejidos se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron en TBS y se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras después de ser lavadas con TBS se incubaron con el sustrato cromogénico diaminobenzidina (Dako Citomation) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

3.2.11.3.1. *Cuantificación de tinciones inmunohistoquímicas en melanoma.*

3.2.11.3.1.1. Adquisición de imágenes.

Se parte de imágenes de lámina delgada observadas con un microscopio Leica DMR-XA con luz transmitida y un objetivo de 20x. La iluminación de la muestra, así como las posiciones de los filtros de campo y del condensador, permanecieron constantes durante todo el proceso de adquisición de las imágenes para que ninguno de estos factores influya en los valores de intensidades. Las imágenes se adquirieron con una cámara digital en color Leica DC-100 (Leica Microsystems) con una resolución de 768 x 574 píxeles.

3.2.11.3.1.2. Procesamiento de Imágenes.

El procesamiento y análisis de las imágenes se realizó con el programa Leica Qwin (Leica Imaging Systems). Una vez adquirida la imagen (Figura 3.1 A y B) el sistema detecta la zona de estudio (Figura 3.1 C y D) que correspondería a la zona de sudoríparas o de melanoma respectivamente. En función de sus valores de intensidad, el sistema permite al operador realizar interactivamente correcciones en las zonas detectadas. Para determinar el número de células del área de tinción, el programa detecta e individualiza los núcleos en función de su intensidad utilizando un algoritmo de “grey watershed” y varias operaciones de morfología matemática (última erosión y apertura) (Figura 3.2 C y D). Al finalizar la

detección de los núcleos el operador comprueba si es correcta, pudiendo, si es necesario, corregir los errores borrando o marcando núcleos. Las áreas de tinción inmunohistoquímica son detectadas en función de su color, determinándose de forma interactiva el rango de tonalidades de tinción que marcaremos como positiva y aplicando dicho rango para todas las imágenes analizadas (Figura 3.2 E y F). Utilizando estas imágenes como máscaras se cuantificaron los siguientes parámetros:

-Área de tinción. Área ocupada por la tinción inmunohistoquímica en la zona de estudio (Figura 3.2)

-Nº de núcleos. Número de núcleos detectados en la zona de estudio.

-Transmitancia en la banda verde. En microscopía de transmisión se define la transmitancia como el cociente entre la intensidad de luz transmitida por la muestra I y la intensidad de luz que incide en la muestra I_0 . $T = I / I_0$. En nuestro caso I_0 valdría 255 e I sería el valor de intensidad de la banda verde para cada punto de tinción. El valor de T viene a ser un porcentaje de la cantidad de luz transmitida por la zona de tinción, valdría 1 en caso de que la tinción fuese completamente transparente y 0 si fuese completamente opaca.

-Densidad óptica (DO). Se define como el $-\log T$ o lo que es lo mismo $DO = \log (I_0/I)$. El valor de la DO sería directamente proporcional a la intensidad de tinción.

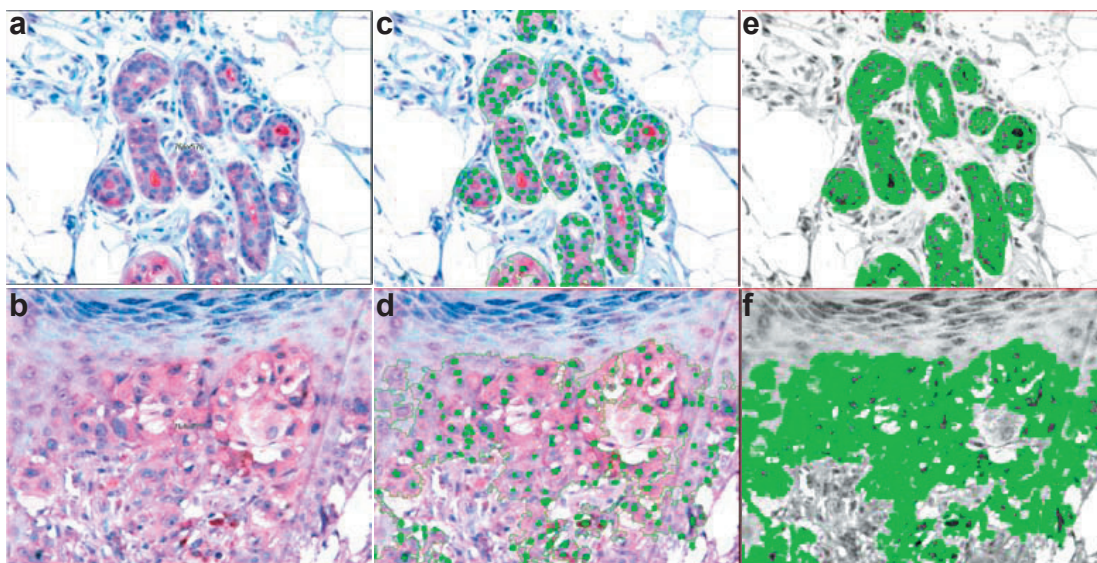


Figura 3.2. **Cuantificación inmunohistoquímica de biopsias.** (a), (c) y (e) corresponden a inmunotinción de glándulas sudoríparas y (b), (d) y (f) de melanoma.

3.2.12. Análisis del ciclo y muerte celular.

Este método se basa en la tinción del DNA con yoduro de propidio, compuesto fluorescente que se intercala entre las bases de DNA emitiendo fluorescencia, de tal modo que la intensidad de la misma es proporcional a la cantidad de DNA de la célula. En esta técnica, la fijación de las células permite que el yoduro de propidio penetre en todas ellas y que tras un período de incubación adecuado pueda ser detectado y cuantificado por

citometría de flujo. La tinción con yoduro de propidio presenta una doble aplicación: por una parte permite analizar el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, y por otra, el porcentaje de células apoptóticas, ya que, como consecuencia de la fragmentación del DNA y formación de cuerpos apoptóticos, aparece un pico hipodiploide característico (Darzynkiewicz y cols., 1992).

Las células se lavaron dos veces con PBS y se despegaron de la placa mediante tripsinización con una solución 0,25% Tripsina-0,02% EDTA. Posteriormente, se añadió el medio de cultivo correspondiente suplementado con 10% de suero fetal para detener la tripsinización. También se recogió el medio de cultivo con el fin de no perder células que se habían despegado de la placa como consecuencia del proceso de apoptosis. De esta forma, se obtuvo una suspensión de células que se centrifugó a 500xg durante 5 min y a 4°C. El sedimento celular se lavó con PBS. A continuación, tras resuspender las células en PBS frío, se fijaron añadiendo la cantidad correspondiente de etanol absoluto (a -20°C) para dejarlo al 70% y se mantuvieron a -20°C no menos de 12h. Para la tinción con yoduro de propidio se centrifugaron a 900xg y a 4°C durante 5 min. El sedimento celular se resuspendió en 2 ml de PBS frío, centrifugándose nuevamente en las mismas condiciones con el fin de eliminar restos de etanol. Después de esta última centrifugación, las células se resuspendieron en 300 µl de PBS con RNasa A 100 µg/ml y yoduro de propidio 5 µg/ml a temperatura ambiente y se incubaron 30 min a 37°C. Tras la incubación, se mantuvieron a 4°C y protegidas de la luz hasta el momento de ser analizadas en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA) utilizando el programa CellQuest suministrado por el fabricante. En cada condición se analizaron al menos 10.000 células.

3.2.13. Análisis de la actividad caspasa 3.

Para la determinación de la actividad caspasa 3 se recogió el medio de cultivo de las distintas placas sometidas a los distintos tratamientos y se centrifugó a 500xg durante 5 min a 4°C, para recoger todas las células en suspensión que se pudieran despegar como consecuencia del proceso de muerte celular. A cada placa se añadió 1 ml de PBS y, sobre hielo, se levantaron las células mediante rascado con espátula. El volumen recogido con las células en suspensión se juntó con éste y se centrifugó 1 min a 10.000xg. A continuación, el sedimento de células obtenido se resuspendió en 100 µl del tampón de lisis (Tris 10mM pH 7,5, NaCl 130 mM y Tritón X-100 al 1%). Los tubos se agitaron y se mantuvieron a 4°C durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron en frío durante 10 min a 15000xg. Del sobrenadante, en el que se encuentra el extracto proteico, se hicieron alícuotas que fueron almacenadas a -70°C.

Para cuantificar la actividad caspasa 3 se utilizó una mezcla de reacción compuesta de: 25 µl de extracto proteico, 325µl de tampón de ensayo (20 mM Hepes pH 7,5, 10% glicerol, 2 mM DTT) y 5 µl del sustrato de la caspasa-3 (20 µM, *Ac-DEVD-AMC*, *caspase-3 fluorogenic substrate*) (PharMigen). Tras 2 horas de incubación en oscuridad a 37°C, la actividad enzimática se determinó en un fluorímetro a una longitud de onda de excitación de

380 nm y una longitud de onda de emisión de 440 nm. Definimos una unidad de actividad caspasa 3 como la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento de 1 unidad arbitraria en el fluorímetro después de 2 horas de incubación con la mezcla de reacción. Los resultados se expresan en unidades de actividad caspasa 3 por μg de proteína.

3.2.14. Determinación de la producción de radicales libres de oxígeno.

Las células sometidas a los distintos tratamientos se tripsinizaron y se lavaron con PBS dos veces. A continuación, se resuspendieron aproximadamente 5×10^5 células de cada condición en 300 μl de PBS con la sonda di-acetoximetil ester del 6-carboxi-diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (Molecular Probes) a una concentración de 5 μM . Se incubaron durante 30 minutos a 37°C y se lavaron con PBS 1 vez. Para este tipo de ensayo fue necesario determinar la población de células muertas. Para detectar y descartar la proporción de células muertas se añadió yoduro de propidio a una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$. Inmediatamente después se pasaron por un citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA) y se analizaron utilizando el programa CellQuest suministrado por el fabricante. Siempre se llevaron en paralelo, como control, células sin incubar con la sonda para analizar el tamaño y morfología celular, y células tratadas con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 0,5 mM durante 30 minutos a 37°C como control positivo de los experimentos. Para cada condición se analizaron 10.000 células.

3.2.15. Determinación de la carbonilación de proteínas.

Para la determinación de la carbonilación de proteínas se utilizó *Oxyblot Oxidized Protein Detection Kit* (Chemicon Internacional). Células sometidas a distintos tratamientos se lavaron dos veces con PBS y se despegaron de la placa mediante tripsinización. El sedimento celular se lavó con PBS. A continuación, se llevó a cabo la derivación de las proteínas celulares (20 μg) mediante la incubación con dinitrofenilalanina (DPNH) durante 30 minutos. Las muestras proteicas así derivadas se fraccionaron en geles al 12% y se procesaron mediante *Western-blot*. Junto a las muestras derivadas se fraccionaron muestras control sin derivar. El anticuerpo primario utilizado fue anti-DPNH a una dilución 1:500.

3.2.16. Determinación del potencial de membrana mitocondrial.

Para la determinación del potencial de membrana mitocondrial se utilizó TMRM, tetra metil rodamina metil ester, (Molecular Probes) a una concentración final de 0,5 μM . Las células sometidas a distintos tratamientos se lavaron dos veces con PBS y se despegaron de la placa mediante tripsinización. El sedimento celular se lavó con PBS. A continuación, se resuspendieron aproximadamente 5×10^5 células, de cada condición, en 300 μl de PBS con la sonda a una concentración de 0,5 μM . Las células se incubaron durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Asimismo, siempre se analizó en paralelo una alícuota de células incubadas en ausencia de sonda para estudiar la morfología y el tamaño celular. Para conocer el potencial de membrana mitocondrial en las diferentes fases del ciclo celular (G_0/G_1 , S y G_2/M), las células se tiñeron posteriormente con 5 $\mu\text{g/ml}$ Hoescht 33342 (Molecular Probes) en PBS durante 10 minutos a 37°C y protegidas de la luz. Las células incubadas con las distintas

sondas se analizaron en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA) utilizando el programa CellQuest suministrado por el fabricante. En cada condición se analizaron al menos 10.000 células.

3.2.17. Determinación de la masa mitocondrial celular.

Para la determinación de la masa mitocondrial celular se utilizó la sonda NAO, nonyl acridine orange, (Molecular Probes) a una concentración final de 20µg/ml. Las células se lavaron dos veces con PBS y se despegaron de la placa mediante tripsinización. A continuación se resuspendieron aproximadamente 5×10^5 células, de cada condición, en 300 µl de PBS con la sonda a una concentración de 20µg/ml. Para conocer la masa mitocondrial en las diferentes fases del ciclo celular (G_0/G_1 , S y G_2/M), las células se tiñeron posteriormente con 5 µg/ml Hoechst 33342 (Molecular Probes) en PBS durante 10 minutos a 37°C y protegidas de la luz. 10000 células incubadas con las sondas se analizaron en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA) utilizando el programa CellQuest suministrado por el fabricante.

3.2.18. Análisis “*in vivo*” de la dinámica mitocondrial.

Para la adquisición de imágenes *in vivo* de mitocondrias en distintas condiciones, células C9pßgfp3'β que expresan establemente gfp en sus mitocondrias (ver apartado 4.4.3) se crecieron en placas de cultivos de vidrio. Las imágenes se tomaron cada 3 minutos durante 1 hora y media usando un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200 acoplado a una cámara Coolsnap FX CCD (Roper Scientific) con un objetivo 40x. Se tomaron imágenes de fluorescencia (gfp) y de campo visible simultáneamente. Las imágenes se procesaron usando el programa Metamorph 6.1r6 (Universal Imaging).

3.2.19. Determinación de la alcalinización de gránulos celulares.

Para la determinación de la alcalinización de gránulos celulares debida a la inhibición de ATPasas de tipo V con bafilomicina B1 se utilizó la sonda fluorescente naranja de acridina. Esta molécula posee la particularidad de absorber en dos longitudes de onda diferentes y consecuentemente, emitir luz verde y luz roja según la excitación. Cuando los gránulos celulares se acidifican esta molécula se protona quedando atrapada dentro de los mismos. La acumulación de naranja de acridina en este pequeño espacio produce una emisión de luz verde suficiente para excitar a moléculas adyacentes produciéndose una emisión en luz roja. La alcalinización de los orgánulos permite la salida de nuevo de la molécula perdiéndose la señal en rojo y sólo siendo visible la emisión de luz verde.

Células C9 sometidas a diferentes tratamientos se incubaron durante 30 minutos con naranja de acridina, en el mismo medio de cultivo, a una concentración final de 1µM. Las células se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron durante 20 minutos con paraformaldehído al 2% en PBS. Las preparaciones se observaron utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DMIRB equipado con un filtro de excitación para luz azul (Leica Microsystem, Suiza, BP 470/40). La adquisición de las imágenes digitales se llevó a cabo con una cámara DC120 acoplada a un ordenador.

3.2.20. Medida del flujo glucolítico celular.

La medida del flujo glucolítico se determinó midiendo la concentración de lactato en el medio de cultivo mediante un ensayo enzimático acoplado que mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340nm la aparición de NADH. El método se basa en la conversión de L-lactato a piruvato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia de NAD^+ y con formación de NADH. La adición de sulfato de hidracina permite el secuestro del piruvato formado, desplazando la reacción hacia la producción de piruvato.

Células al 60% de confluencia se preincubaron, o no, durante 30 minutos con oligomicina $6\mu\text{M}$ y se tomaron alícuotas de $100\mu\text{l}$ del medio de cultivo transcurridas dos horas tras la preincubación con el inhibidor de la H^+ -ATP sintasa. Las muestras se desproteinizaron precipitando con ácido perclórico al 6% (4 volúmenes) y posteriormente se neutralizaron los sobrenadantes en presencia de indicador universal. Se mezclaron en la cubeta de reacción $200\mu\text{l}$ de agua, $500\mu\text{l}$ de la mezcla de reacción (Glicina 1M , Hidracina- SO_4 $0,4\text{M}$, EDTA $1,3\text{mM}$, NAD^+ $7,5\text{mM}$, $\text{pH}=9,5$) y en último lugar $300\mu\text{l}$ de muestra y se realizó una prelectura a 340nm en el espectrofotómetro (E_0). A continuación, se añadieron $10\mu\text{l}$ de la enzima LDH (Roche) y se midió a la misma longitud de onda transcurridos 45 minutos (E_1). Se llevaron de forma paralela controles de medida de lactato en agua (blanco, para calibrar el espectrofotómetro) y medida de lactato en el medio de cultivo de las células. Aplicando la ley de Lambert-Beer ($E_1-E_0=C \cdot l \cdot \epsilon$) se calculó la concentración de lactato expresado como nmoles de lactato producido por μg de proteína y hora.

3.2.21. Determinación de la respiración mitocondrial.

El consumo de oxígeno celular se determinó usando un electrodo tipo Clark en cubeta de 2 ml termostáticamente controlada (30°C) y sometida a agitación magnética. Las células se tripsinizaron, se lavaron en PBS y se resuspendieron en $200\mu\text{l}$ de medio de respiración (Sacarosa 225mM , KCl 10mM , EGTA 1mM , H_2KPO_4 10mM , MgCl_2 5mM , TrisKCl 10mM pH 7 y BSA $0,05\%$). El ensayo se inició añadiendo succinato a la cubeta a una concentración final 100mM . Una vez estabilizada la medida se incorporaron las células resuspendidas en medio de respiración y se registró la respiración durante 2 minutos. A continuación, se añadió oligomicina $6\mu\text{M}$ y finalmente FCCP $2\mu\text{M}$. Los parámetros respiratorios medidos se expresaron como nmoles de oxígeno consumidos por minuto y por dos millones de células.

3.2.22. Análisis estadístico.

La distribución de los valores de los marcadores moleculares y de las variables categóricas se compara mediante las pruebas de χ^2 y t de Student. Los perfiles de expresión de los marcadores se analizaron mediante conglomerados jerárquicos utilizando como herramientas el programa “Cluster Program” (<http://ep.ebi.ac.uk/EP/EPCLUST>) y el software SPSS. Los análisis de supervivencia se llevaron a cabo mediante análisis de Kaplan-Meier y regresión de Cox. La supervivencia global (SG) viene determinada a partir

del momento en el que se diagnostica la patología y el momento de cierre del estudio. La supervivencia libre de enfermedad (SLE) comprende el periodo de tiempo desde el momento en que se interviene quirúrgicamente el tumor hasta que se produce la recaída.



RESULTADOS

4.1. LA HUELLA BIOENERGÉTICA DEL CÁNCER.

Resultados previos de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que los hepatomas de rata presentan una marcada reducción del contenido de sus mitocondrias (López de Heredia y cols., 2000). Basándonos en este resultado nos propusimos extender el estudio a distintos carcinomas humanos (Cuezva y cols., 2002; Isidoro y cols., 2004). A continuación, se presentan los resultados de los carcinomas que estudié personalmente: adenocarcinoma de próstata, carcinoma escamoso de esófago y melanomas. El estudio se realizó mediante un análisis proteómico sencillo (próstata y esófago) e inmunocitoquímico (melanomas) basándonos en la cuantificación de la expresión de marcadores mitocondriales y de la vía glucolítica. Para ello, hemos utilizado la proteína cuello de botella de la fosforilación oxidativa, la subunidad catalítica de la H^+ -ATP sintasa (β - F_1 -ATPasa) de la mitocondria, y dos marcadores de la cadena respiratoria, las subunidades I y IV de la citocromo c oxidasa (COX I y IV). Además, se han medido los niveles de Hsp60, que es una proteína estructural de la mitocondria, que nos da una idea de la masa mitocondrial y nos sirve como factor de normalización de la expresión de β - F_1 -ATPasa. El cociente β - F_1 /Hsp60 define el “potencial bioenergético de la mitocondria” de un determinado tipo celular (Cuezva y cols., 2007).

Como las células tienen distinto contenido de mitocondria, con objeto de tener una idea de la capacidad mitocondrial global de la célula hemos definido el índice bioenergético celular (índice BEC) (Cuezva y cols., 2002), que es la expresión normalizada del potencial bioenergético de la mitocondria respecto del potencial glucolítico de la misma expresado por los marcadores de la vía glucolítica como son la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), piruvato quinasa (PK) y hexoquinasa III (HK-III). El análisis de expresión de marcadores se realizó mediante técnicas de *Western-blot* en extractos proteicos obtenidos de cortes congelados de biopsias de tejido normal y tumoral del mismo paciente (esófago y próstata) y mediante inmunohistoquímica en secciones de biopsias (melanomas).

4.1.1. Carcinoma escamoso de esófago.

Los carcinomas escamosos de esófago analizados presentan una reducción significativa de los niveles de expresión de β - F_1 -ATPasa al comparar con las correspondientes muestras de tejido normal (Figuras 4.1). Cabe destacar que, mientras que la expresión de los marcadores mitocondriales (COXI y COXIV) no presenta diferencias significativas entre las muestras comparadas, la expresión de Hsp60 aumenta muy significativamente (Figuras 4.1). Asimismo, los niveles de expresión de GAPDH y PK no se vieron significativamente afectados (Figuras 4.1). El potencial bioenergético de la mitocondria (razón β - F_1 /Hsp60) mostró una reducción significativa en los carcinomas (Figura 4.1) de tal manera que el índice BEC también refleja una diferencia significativa entre las muestras de biopsias de los tejidos normales y tumorales (Figura 4.1). Estos resultados sugieren que la capacidad mitocondrial en carcinomas escamosos de esófago está disminuida de forma concurrente con un aumento del potencial glucolítico del tumor.

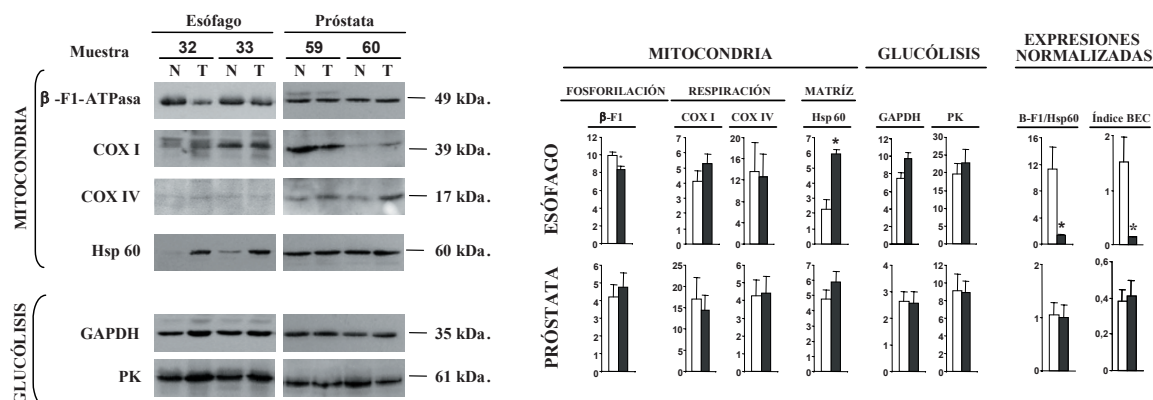


Figura 4.1. Análisis mediante *Western-blot* y cuantificación de los niveles de expresión de marcadores mitocondriales y glucolíticos en carcinomas escamosos de esófago y adenocarcinomas de próstata. Muestras proteicas de tejido normal (N) y tumoral (T) se fraccionaron por SDS-PAGE y se incubaron con anticuerpos específicos contra los correspondientes marcadores de fosforilación oxidativa (β -F₁-ATPasa), de respiración (COXI y COXIV) y estructurales de la mitocondria (Hsp 60) y de la vía glucolítica (GAPDH y PK). La masa molecular del marcador se muestra a la derecha de la imagen. Se muestran los resultados de dos pacientes representativos. Los histogramas muestran la media \pm S.E.M. del contenido celular de cada marcador determinado por análisis densitométrico (unidades arbitrarias) en las muestras normales (\square) y tumorales (\blacksquare) de esófago (n=6) y de próstata (n=9). El cociente β -F₁/Hsp60 da una idea del potencial bioenergético de la mitocondria. El índice BEC resulta de la normalización del índice anterior respecto de los niveles de expresión de la proteína glucolítica GAPDH en la misma muestra. *, P<0,05 al comparar frente a las muestras normales con el test de *t* de Student.

4.1.2. Adenocarcinomas de próstata.

El análisis de los adenocarcinomas de próstata indica la ausencia de diferencias significativas en la expresión de marcadores mitocondriales y glucolíticos entre tejido normal y tumoral (Figuras 4.1). Por este motivo la razón β -F₁/Hsp60 y el índice BEC no se encuentran alterados en adenocarcinomas de próstata (Figuras 4.1). Estos resultados sugieren que la carcinogénesis en próstata no conlleva alteraciones en la capacidad mitocondrial de la célula ni de un aumento del potencial glucolítico del tumor, al menos cuando estos parámetros son analizados con los marcadores metabólicos aquí descritos.

4.1.3. Melanomas.

Se analizaron un total de 75 biopsias de piel, correspondientes a nevus comunes no malignos (nevus nevocelular, nevus atípico y nevus de Spitz) (n=21), melanomas malignos (n=41) y metástasis de melanomas (n=13) mediante inmunohistoquímica (Figura. 4.2). Se cuantificó la señal de los marcadores mitocondriales β -F₁-ATPasa y Hsp60 y de los marcadores glucolíticos GAPDH, PK y HK-III y se realizaron los cocientes derivados de ellos. Los niveles de expresión de los marcadores en todas las muestras fueron normalizados respecto de la expresión de cada marcador obtenido en la glándula sudorípara de la misma biopsia, usado como control interno de la inmunohistoquímica.

Los resultados (Tabla 4.1 (Anexo 1)) no muestran variaciones significativas en el potencial mitocondrial (razón β -F₁-ATPasa/Hsp60) de melanomas y metástasis respecto

de la lesión benigna de los nevus. La expresión de HK-III se encuentra aumentada de forma significativa en los melanomas. Por el contrario, la expresión de PK y GAPDH no es diferente entre nevus y melanomas, aunque PK está disminuida en las metástasis (Tabla 4.1 (Anexo 1)). El único índice bioenergético que se aprecia significativamente disminuido en melanomas y metástasis es el BEC_{HK} (Tabla 4.1 (Anexo 1)).

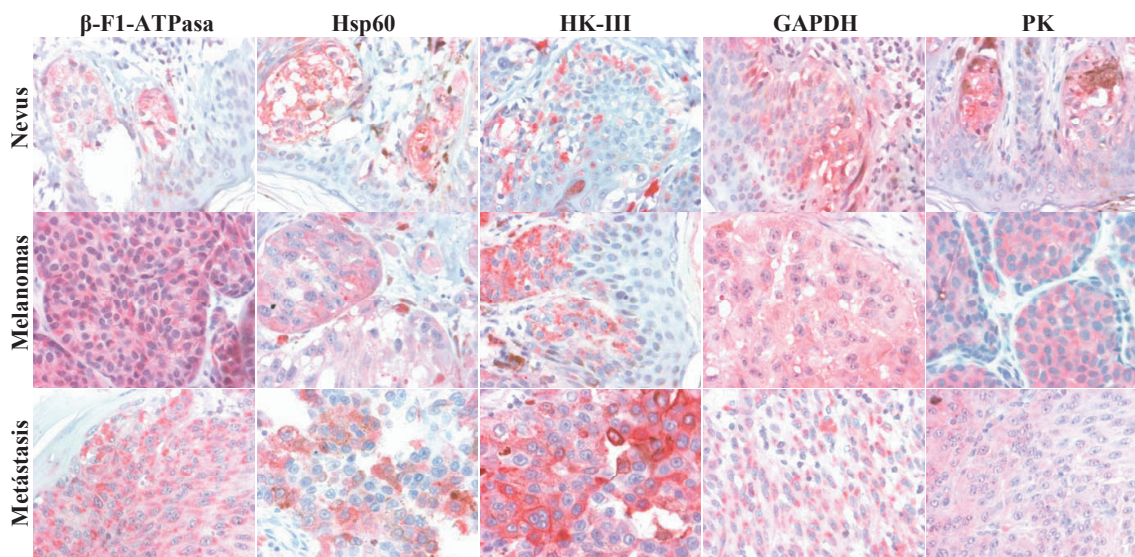


Figura 4.2. **Análisis inmunohistoquímico de la expresión de los marcadores mitocondriales y glucolíticos en biopsias de melanoma.** Se muestran fotografías representativas de la inmunotinción de los distintos marcadores en biopsias de melanoma, metástasis y nevus nevocelular.

La figura 4.3 resume las características clínico-patológicas de la cohorte de pacientes estudiados y las correlaciones existentes entre las distintas variables clínico-patológicas con la supervivencia global y libre de enfermedad de los pacientes. Como puede apreciarse, los melanomas con un índice de Breslow alto, con presencia de úlceras, con crecimiento radial, con evidencias de mitosis y en pacientes de menor edad tienen un peor pronóstico clínico, tanto en lo que respecta a la supervivencia global (SG) (Breslow y úlceras) como en lo relativo a la supervivencia libre de enfermedad (SLE). Estos resultados están de acuerdo con las características clínico-patológicas de peor riesgo que se han descrito para este tipo de neoplasia (Balch y cols., 2001). La tabla 4.2 (Anexo 1) resume el análisis univariable y multivariable de la regresión de Cox del riesgo relativo asociado con las distintas variables clínicas. De acuerdo con la *American Joint Committee on Cancer* (Balch y cols., 2001) el aumento de espesor del tumor (Breslow), la existencia de mitosis y la ulceración son variables de peor pronóstico. En su conjunto, estos resultados nos indican que la población que hemos estudiado es una muestra representativa de este tipo de tumores.

La tabla 4.3 (Anexo 1) resume los valores de expresión de los marcadores del metabolismo energético, así como de los índices que de ellos se derivan, en los melanomas de acuerdo con las diferentes características clínico-patológicas. En líneas generales, se observa una pérdida de la expresión de todos los marcadores metabólicos estudiados en los

RESULTADOS

melanomas que tienen características clínico-patológicas de peor pronóstico, como es el aumento del Breslow, Clark, presencia de mitosis, ulceración y crecimiento vertical (Figura 4.3).

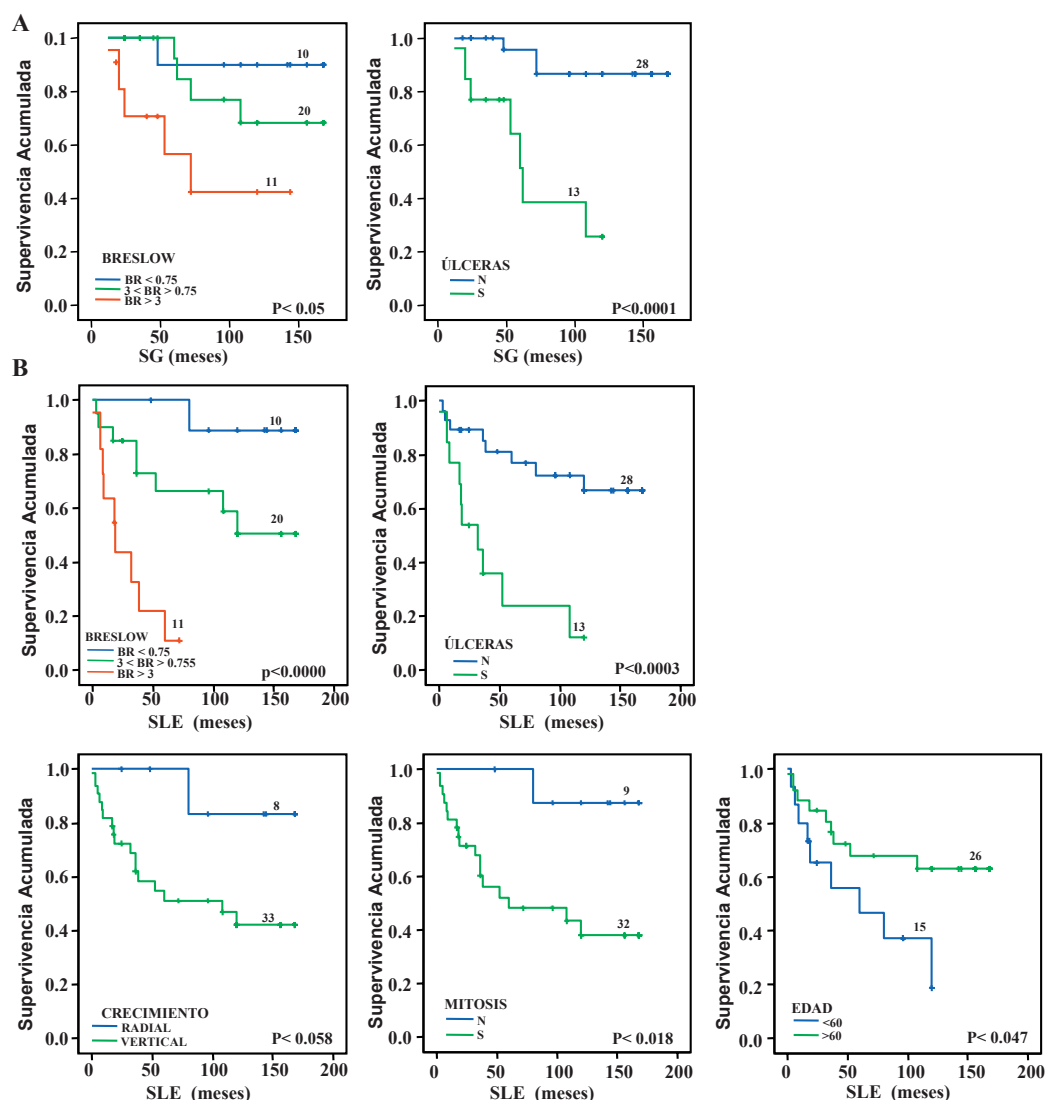


Figura 4.3. **Curvas de supervivencia de las características clínico-patológicas de la población de melanomas de estudio.** Curvas de supervivencia global (SG) (A) y de supervivencia libre de enfermedad (SLE) (B) de Kaplan-Meier de las características clínico-patológicas de los pacientes de melanoma. Un Breslow mayor, la presencia de úlceras y mitosis y una menor edad son características de un peor pronóstico.

Se comparó el patrón de expresión de los marcadores metabólicos mediante el programa EPCLUST (<http://ep.ebi.ac.uk//EPCLUST>) (ver materiales y métodos) de las 41 biopsias de melanomas y las 13 de metástasis por agrupación jerárquica. Para realizar este análisis se tomaron como referencia los valores de expresión de los nevus nevocelulares. Este análisis permite la discriminación al 100% de los melanomas y de las metástasis por la huella metabólica que expresan (Figura 4.4). Cabe destacar, que ninguna de las biopsias de melanomas fue incluida por el programa en el grupo de las metástasis ni al revés (Figura. 4.4). Ambos grupos de biopsias se distinguen básicamente por una marcada caída del marcador

glucolítico PK en el grupo de las metástasis (Figura 4.4) de acuerdo con la diferencia significativa encontrada para la expresión de PK entre metástasis y melanoma (Tabla 4.1 (Anexo 1)). Además, este análisis permite la discriminación de los melanomas en base a dos huellas metabólicas distintas (A y B en Figura 4.4). Concretamente, la diferencia más acusada entre la huella A y B es la menor expresión de Hsp60, HK y PK en los melanomas de la huella metabólica B (Figura 4.4 y Tabla 4.4). Hay que destacar que la huella metabólica B está significativamente asociada con marcadores de peor pronóstico clínico (Tabla 4.4). Así, la huella B corresponde de forma mayoritaria y significativa a pacientes que poseen melanomas con un mayor índice de Breslow y de Clark, con presencia de mitosis y de úlceras y son de crecimiento vertical (Tabla 4.4). Debemos mencionar que ninguno de los marcadores metabólicos correlaciona de forma independiente con la supervivencia global o libre de enfermedad de los pacientes. Sin embargo, cuando se combina la expresión de los marcadores β -F₁-ATPasa y GAPDH, de tal manera que expresan la actividad mitocondrial global del melanoma (razón β -F₁/GAPDH), se observa como un menor valor en esta relación, que es indicativo de pérdida de actividad mitocondrial por célula, correlaciona con un peor pronóstico clínico de los pacientes (Figura 4.5).

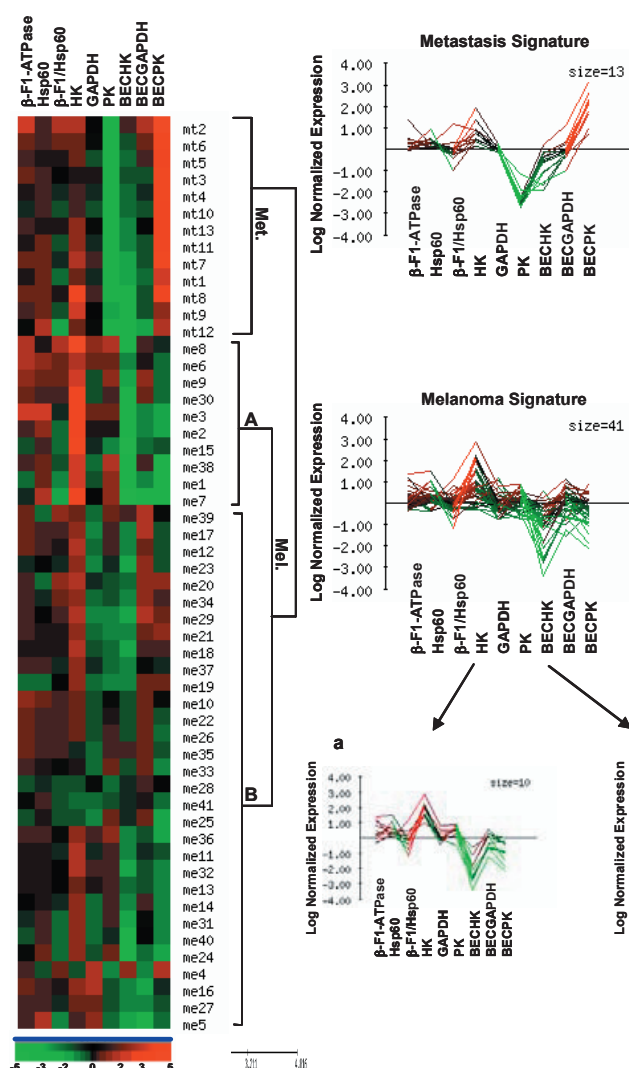


Figura 4.4. **Expresión de los marcadores mitocondriales y glucolíticos en biopsias de melanomas (Mel.) y metástasis (Met.).** El análisis de expresión se realizó mediante EPCLUST a partir de los datos de expresión de β -F₁-ATPasa, Hsp60, HK-III, GAPDH, PKm, y de los índices que de ellas se derivan. Filas: número de identificación de biopsia; Columnas: marcadores y sus relaciones derivadas. La expresión de proteínas se normalizó frente a nevus nevocelular de acuerdo con la siguiente escala: rojo, alta expresión; negro, expresión media; verde, baja expresión. El dendrograma (matriz a la derecha del panel) representa las similitudes globales en los perfiles de expresión proporcionando 3 grupos distintos, uno para las metástasis y dos para los melanomas. Las gráficas representan el fenotipo bioenergético de los diferentes grupos.

Grupo							
Características			A		B		
			n	Valor	n	Valor	
CATEGÓRICAS							
<i>CLARK</i>						8.475	
	I+II	5	50	3	9.7	0.014	
	III	4	40	16	51.6		
	IV+V	1	10	12	38.7		
<i>Úlceras</i>						6.141	
	N	10	100	18	58.1	0.013	
	S	0	0	13	41.9		
<i>Edad</i>						3.125	
	<60	6	60	9	29	0.077	
	>60	4	40	22	71		
<i>Crecimiento</i>						7.828	
	Radial	5	50	3	9.7	0.005	
	Vertical	5	50	28	90.3		
<i>Breslow</i>						14.97	
	<0.75	7	70	3	9.7	0.002	
	0.75-1.5	1	10	7	22.6		
	1.5-3	1	10	11	35.5		
	>3	1	10	10	32.3		
<i>Sexo</i>						1.867	
	Hombre	3	30	17	54.8	0.172	
	Mujer	7	70	14	45.2		
<i>Mitosis</i>						11.176	
	N	6	60	3	9.7	0.001	
	S	4	40	28	90.3		
NUMÉRICAS							
<i>β-F1-ATPasa</i>			10	1.45 ± 0.19	31	1.08 ± 0.03	0.099
<i>Hsp60</i>			10	1.46 ± 0.16	31	1.05 ± 0.04	0.034
<i>β-F1/Hsp60</i>			10	1.06 ± 0.17	31	1.06 ± 0.04	0.984
<i>HK</i>			10	0.36 ± 0.04	31	0.13 ± 0.01	0.001
<i>GAPDH</i>			10	1.16 ± 0.10	30	1.02± 0.08	0.296
<i>PK</i>			10	0.42 ± 0.05	31	0.24 ± 0.01	0.005
<i>BEC_{HK}</i>			10	3.29 ± 0.62	31	8.6 ± 0.53	0.000
<i>BEC_{GAPDH}</i>			10	0.92 ± 0.11	30	1.18 ± 0.43	0.072
<i>BEC_{PK}</i>			10	2.78 ± 0.40	31	4.65 ± 0.31	0.002

Tabla 4.4. Características clínico-patológicas y niveles de expresión de los marcadores mitocondriales en los grupos A y B de biopsias de melanoma. Los valores de las variables categóricas son expresados como porcentaje de tumores en ese grupo. Las variables categóricas se compararon por χ^2 . Los niveles de expresión de los marcadores son expresados en unidades arbitrarias como media \pm S.E.M. En negrita se indican los datos significativos, $p < 0,05$ cuando comparamos frente al grupo A.

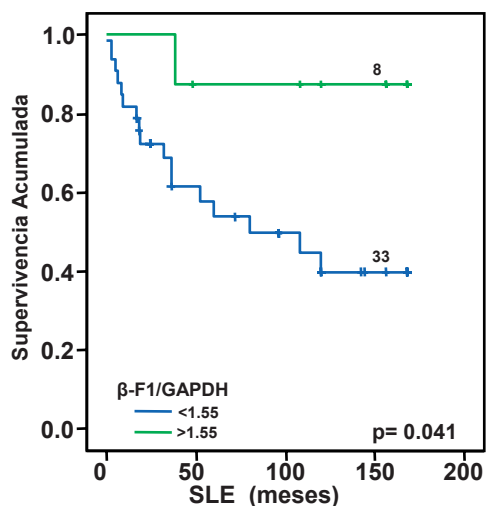


Figura 4.5. Curva de supervivencia para la razón $\beta\text{-F}_1\text{-ATPasa/GAPDH}$. Curva de supervivencia libre de enfermedad (SLE) de Kaplan-Meier de la razón $\beta\text{-F}_1\text{-ATPasa/GAPDH}$ de los pacientes de melanoma. Una razón menor, es decir, una menor función bioenergética de la mitocondria, se corresponde con un peor pronóstico del paciente.

4.2. ONCOGENES Y HUELLA BIOENERGÉTICA CELULAR.

La proliferación descontrolada de los tumores resulta de las alteraciones genéticas y/o de la inactivación de reguladores del ciclo celular (Vogelstein y Kinzler, 2004). Muchos de estos reguladores del ciclo son oncogenes y genes supresores. En nuestro laboratorio hemos demostrado la existencia de una alteración del proteoma mitocondrial en distintos tipos de neoplasias. En concreto, se observa un aumento de la expresión de proteínas del metabolismo glucolítico de forma concertada a la disminución del potencial bioenergético de la mitocondria (razón β -F₁/Hsp60) (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005). Es por ello, que en este objetivo, en colaboración con el Dr. Arbiser (Govindarajan y cols., 2005; Govindarajan y cols., 2007), hemos estudiado el efecto de distintos oncogenes sobre la huella bioenergética y el metabolismo energético celular “*in vivo*” e “*in vitro*”.

4.2.1. El oncogén PDGF.

La familia de los factores de crecimiento PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) constituye una familia de péptidos (PDGF A, B, C y D) capaces de homodimerizar y heterodimerizar (Betsholtz y cols., 1983). Estos factores ejercen su acción a través de dos receptores tirosina quinasa, PDGF α y PDGF β , desarrollando funciones muy importantes implicadas en el desarrollo (Betsholtz, 2004). El oncogén retroviral *v-sis* deriva del factor de crecimiento PDGF (Betsholtz y cols., 1983). Por este motivo, la señalización vía PDGF es un punto muy importante a estudiar en oncogénesis. En concreto, se ha observado que esta ruta de señalización está implicada en procesos de estimulación de crecimiento autocrino en células tumorales, estimulación de angiogénesis tumoral y reclutamiento y regulación de fibroblastos tumorales (Ostman, 2004).

La línea celular SV7tert, derivada de un angiomiolipoma humano (Arbiser y cols., 2001), expresa de forma activa el receptor PDGF β (Arbiser y cols., 2002). Esta línea celular establecida no es capaz de generar tumores en ratones *nude*. Cuando se transforma con el factor de crecimiento PDGFBB de forma constitutiva (células SV7tertPDGF) esta línea celular adquiere potencial tumorigénico en ratones *nude* (Govindarajan y cols., 2005). En esta línea se estudió el efecto del oncogén en la expresión de las proteínas que definen la huella bioenergética. Como puede observarse (Figura 4.6 A), la expresión constitutiva de PDGFBB promueve un aumento de la expresión de la proteína mitocondrial β -F₁-ATPasa en ausencia de cambios en la expresión de Hsp60, así como de una disminución en la expresión de la proteína glucolítica GAPDH (Figura 4.6 A). Estos cambios conducen a un aumento del potencial bioenergético mitocondrial, ya sea éste expresado por la razón β -F₁/Hsp60 o por el índice BEC (Figura 4.6 A).

Es de destacar que las células SV7tert tumor1 y tumor 2 (Figura 4.6 A), que son dos líneas celulares que se obtuvieron tras la implantación de células parentales SV7tertPDGF en ratones *nude* (Govindarajan y cols., 2005), muestran una reversión del fenotipo bioenergético cuando se comparan con células parentales inductoras de tumor ya que se

RESULTADOS

observa una gran disminución de la huella bioenergética (Figura 4.6 A). Estos resultados parecen sugerir que la proliferación celular “*in vivo*” selecciona células con el fenotipo más glucolítico. Este hecho quedó confirmado al demostrar que las células obtenidas del tumor tienen un mayor flujo glucolítico aeróbico cuando se compara con las células parentales (Figura 4.6 B). Así, las células SV7tert PDGF, que tienen un mayor índice BEC, presentan un flujo glucolítico más bajo que las células SV7tert (Figura 4.6 B) mientras que las células obtenidas del tumor, que tienen un índice BEC más bajo, tienen un mayor flujo glucolítico cuando se las compara con las células parentales promotoras del tumor (Figura 4.6 B).

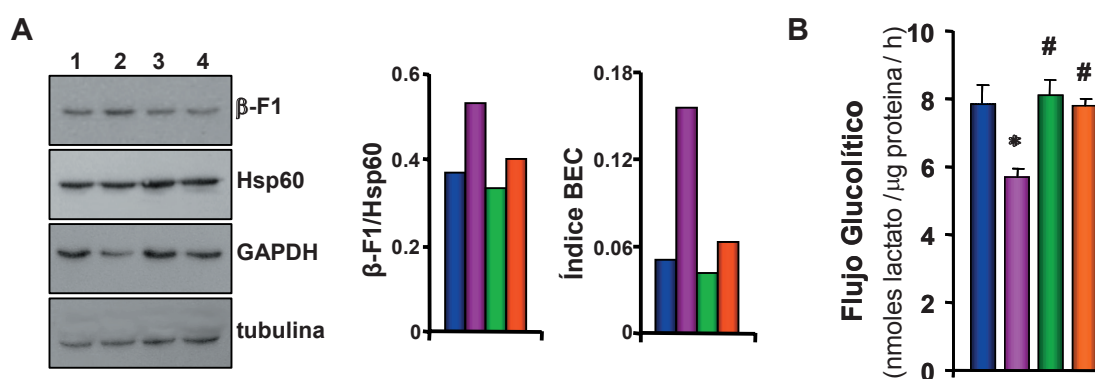


Figura 4.6. Análisis de los niveles de expresión de marcadores mitocondriales y glucolíticos y del flujo glucolítico en células SV7tert, SV7tertPDGF y de las dos líneas tumorales derivadas de esta última tras su implantación en ratones *nude*. (A) Muestras proteicas de células SV7tert (1), SV7tertPDGF (2), SV7tertPDGF tumor 1 (3) y SV7tertPDGF tumor 2 (4) se fraccionaron por SDS-PAGE y se incubaron con anticuerpos específicos contra los marcadores β -F₁-ATPasa, Hsp 60 y GAPDH. La carga diferencial entre las muestras se normalizó por tubulina. El cociente β -F₁-ATPasa/Hsp60 da una idea del potencial bioenergético de la mitocondria. El índice BEC resulta de la normalización del índice mitocondrial de fosforilación con los niveles de expresión de la proteína glucolítica GAPDH. (B) Se realizó la medida del flujo glucolítico de las líneas celulares midiendo la producción de lactato por microgramo de proteína y por hora. El histograma muestra la media \pm S.E.M. de 3 experimentos. *, $P < 0,05$ al comparar frente a la muestra de células parentales SV7tert con el test de *t* de Student, #, $P < 0,05$ al comparar frente a la muestra de células SV7tertPDGF con el test de *t* de Student. ■ SV7tert, ■ SV7tertPDGF, ■ SV7tertPDGF tumor 1, ■ SV7tertPDGF tumor 2.

Con el fin de conocer si estos cambios en el metabolismo de las células tumorales eran originados por la expresión del factor de crecimiento PDGFBB, se estudió el flujo glucolítico en presencia o ausencia de Gleevec, un inhibidor específico de tirosina quinasas que se emplea como droga terapéutica en muchos cánceres humanos (Sawyers y Druker, 1999). Contrariamente a lo descrito por Gottschalk y cols., que observan una disminución de la glucólisis aeróbica en respuesta a Gleevec, es interesante destacar que en nuestro sistema celular el tratamiento con Gleevec originó un aumento de la glucólisis en todas las líneas celulares que secretan constitutivamente PDGFBB (Figura 4.7). Este resultado estaría de acuerdo con el potencial “mitocondriogénico” que hemos detectado en las células SV7tert al transformarlas con PDGFBB (Figuras 4.6 y 4.7).

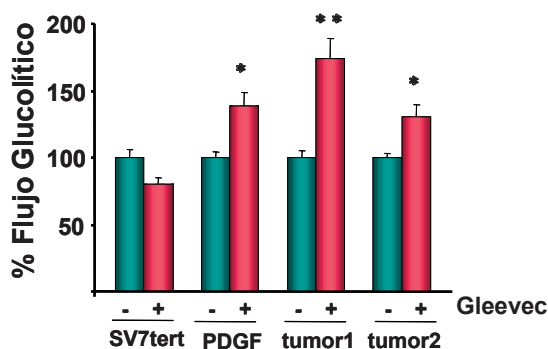


Figura 4.7. El factor de crecimiento PDGFBB favorece el potencial bioenergético de la mitocondria. Células SV7tert, SV7tertPDGF, SV7tert tumor 1 y SV7tert tumor 2 se trataron en ausencia (■) o presencia (■) de Gleevec (10 μ g/ml) durante 24 horas. Se realizó la medida del flujo glucolítico midiendo la producción de lactato de estas líneas celulares por microgramo de proteína y por hora. El histograma muestra la media \pm S.E.M. de 3 experimentos. *, $P < 0,05$ al comparar frente a células no tratadas con el test de *t* de Student.

4.2.2. El oncogén PKB/AKT.

La serina-treonina tirosina quinasa Akt (PKB) es un componente crucial en la cascada de señalización de muchos receptores de membrana y juega un papel fundamental en la proliferación y supervivencia de la célula en respuesta a estímulos de naturaleza muy distinta (Lawlor y Alessi, 2001). A través de la fosforilación de un gran número de sustratos, Akt regula cuatro procesos fundamentales de la célula: supervivencia celular, progresión del ciclo celular, crecimiento de la célula y metabolismo celular (Shaw y Cantley, 2006). En concreto, en la regulación del metabolismo, se ha visto que Akt regula la glucólisis a través de múltiples mecanismos postranscripcionales como pueden ser intensificación de la localización en superficie del transportador Glut-1, estimulación de la actividad de la enzima hexoquinasa (HK) y regulación postranscripcional de la expresión de la enzima fosfo-fructoquinasa 2 (PFK2) (Rathmell y cols., 2003). Son muchas las evidencias que permiten pensar que Akt juega un papel muy importante en la tumorigénesis y en la resistencia al tratamiento con quimioterapia (O'Gorman y Cotter, 2001; Kim y cols., 2005; Shaw y Cantley, 2006). Hace varios años se describió su actividad oncogénica al encontrar homología celular con el oncogen viral *v-akt* (Bellacosa y cols., 1991), y posteriormente se observó que isoformas de Akt se encontraban aumentadas en diferentes tumores humanos (Cheng y cols., 1992; Nakatani y cols., 1999). Más recientemente, se ha estudiado su implicación en el metabolismo tumoral activando glucólisis (Dang y Semenza, 1999; Elstrom y cols., 2004).

La línea celular WM35 proviene de un melanoma humano en fase de crecimiento radial. La introducción del oncogén AKT activo constitutivamente en esta línea celular (WM35PKB) promueve profundos cambios permitiendo el crecimiento en fase vertical del melanoma (Govindarajan y cols., 2007). Entre los cambios más significativos inducidos por este oncogén cabe destacar un aumento en la expresión de la enzima glucolítica GAPDH (Figura 4.8 A), así como un aumento del flujo glucolítico medido por la producción de lactato (Figura 4.8 B) cuando se compara con la línea parental WM35.

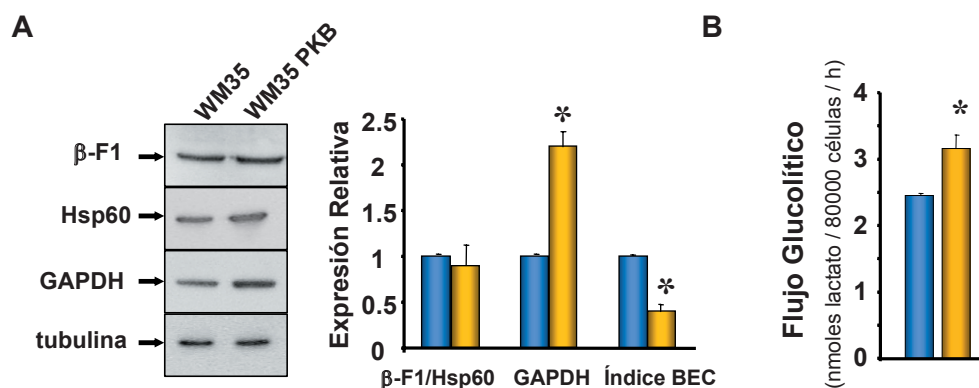


Figura 4.8. **La expresión constitutiva de Akt activa induce glucólisis en células WM35.** (A) Muestras proteicas de células WM35 y WM35PKB que expresan Akt activo se fraccionaron por SDS-PAGE y se incubaron con anticuerpos específicos contra los marcadores β -F₁-ATPasa, Hsp 60 y GAPDH. Se representa un experimento representativo. La carga diferencial entre las muestras se normalizó por tubulina. El cociente β -F₁/Hsp60 da una idea del potencial bioenergético de la mitocondria. El índice BEC resulta de la normalización del índice mitocondrial de fosforilación con los niveles de expresión de la proteína glucolítica GAPDH. El histograma muestra la media \pm S.E.M. de 3 experimentos. *, $P < 0,05$ al comparar frente a células WM35 con el test de t de Student. (B) Medida del flujo glucolítico midiendo la producción de lactato de WM35 y WM35PKB por microgramo de proteína y por hora. El histograma muestra la media \pm S.E.M. de 3 experimentos. *, $P < 0,05$ al comparar frente a células WM35 con el test de t de Student. WM35 (■), WM35PKB (■).

Se ha descrito que la activación de la vía glucolítica por Akt está mediada por la ruta de AMPK (*AMP-Activated Protein Kinase*) (Shaw, 2006). Las células WM35PKB poseen una menor cantidad de AMPK total, a pesar de mantener unos niveles similares de la forma activa (forma fosforilada, P-AMPK) (Figura 4.9). El aumento del flujo glucolítico en células WM35PKB (Figura 4.8 B) es aparentemente independiente a cambios en la forma activa de AMPK (P-AMPK) (Figura 4.9) lo que sugiere que este aumento del flujo glucolítico mediado por Akt ocurre de forma independiente a la ruta de AMPK.

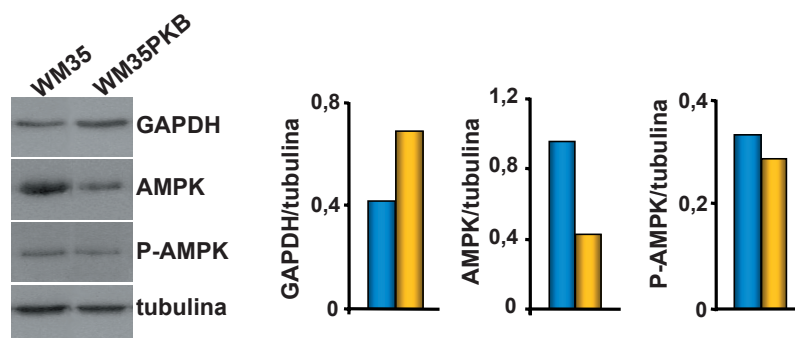


Figura 4.9. **La inducción del metabolismo glucolítico por Akt es independiente de AMPK.** Extractos proteicos de células WM35 (■) y WM35PKB (■) se analizaron por *Western-blot* incubando las membranas con anticuerpos específicos contra la proteína glucolítica GAPDH y la proteína quinasa AMPK y su forma activa (P-AMPK). Se representa un experimento representativo. La carga diferencial entre las muestras se normalizó por tubulina.

Se ha descrito que tras la activación de Akt la subunidad catalítica β -F₁-ATPasa es fosforilada al haberse localizado Akt en distintos compartimentos de la mitocondria (Bijur y Jope, 2003). Este hecho podría sugerir que el aumento del flujo glucolítico en células WM35PKB fuese el resultado de la inactivación por fosforilación de β -F₁-ATPasa, lo que aportaría un nexo para explicar el efecto Warburg en los tumores. Con objeto de verificar esta hipótesis, se procedió al estudio de posibles modificaciones covalentes de β -F₁-ATPasa mediante geles bidimensionales en las líneas celulares WM35 y WM35PKB. Los resultados (Figura 4.10) indicaron la existencia de dos formas inmunorreactivas de la proteína en ambas líneas celulares. La forma mayoritaria posee un punto isoelectrico (pI) más básico que la forma minoritaria de β -F₁-ATPasa (Figura 4.10). Este resultado podría ser compatible con una modificación covalente por fosforilación de la subunidad β -F₁-ATPasa. Sin embargo, la mezcla al 50% de proteínas de ambas líneas no mostró ninguna diferencia significativa en las señales de β -F₁-ATPasa (Figura 4.10). Se usó la señal inmunorreactiva de la proteína Hsp60 como control de posicionamiento de las proteínas de los geles (Figura 4.10). Este resultado sugiere que la expresión de Akt no promueve modificaciones covalentes en la proteína β -F₁-ATPasa, al menos en este sistema experimental.

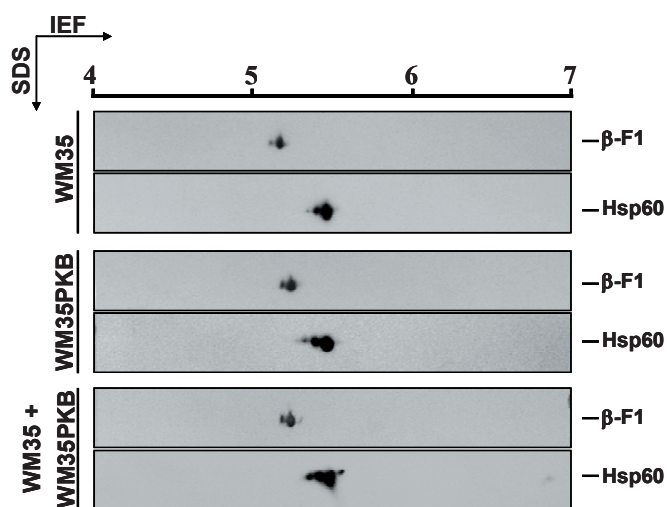


Figura 4.10. **Análisis bidimensional de β -F₁-ATPasa en células WM35 y WM35PKB.** Se realizaron *Western-blot* de extractos de células WM35 y WM35PKB y mezcla de ambos al 50% de geles bidimensionales. En la primera dimensión las proteínas se separaron de acuerdo con su punto isoelectrico (IEF). En la segunda dimensión las proteínas se fraccionaron de acuerdo a su tamaño (SDS). Las membranas se incubaron con anticuerpos específicos contra β -F₁-ATPasa y Hsp60 que nos sirvió de control. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes.

4.2.3. El oncogén RAS.

El producto génico de RAS es una proteína G monomérica de 21KDa. localizada en membrana que transduce la información biológica desde la superficie de la célula a componentes citoplasmáticos dentro de la célula. La señal es así conducida al núcleo a través de segundos mensajeros y en último término induce división celular. Cada célula contiene al menos 3 proteínas Ras pro-oncogénicas distintas. Mutaciones activadoras de estas proteínas Ras promueven una señalización constitutiva, estimulando proliferación celular e inhibiendo la apoptosis. Mutaciones oncogénicas en el gen RAS se encuentran aproximadamente en un 30% de los tumores humanos, con una mayor incidencia en tumores

RESULTADOS

de páncreas, tiroides, colon, pulmón y en determinadas leucemias. La familia de oncogenes RAS está involucrada en el desarrollo tanto de tumores primarios como de metástasis, haciendo que esta proteína G sea una buena diana terapéutica para el desarrollo de drogas antitumorales. En el caso particular de melanomas, se sabe que la activación de Ras está implicada en la transición de un crecimiento radial del melanoma a un crecimiento vertical y, en consecuencia, en la adquisición del carácter invasivo (Cohen y cols., 2002).

La introducción del oncogén RAS en células L10BIOBR (melanocitos murinos inmortalizados) produce una disminución altamente significativa en el flujo glucolítico basal de estas células con respecto a las células control transfectadas con GFP (Figura 4.11 A). Este resultado sugiere que la introducción del oncogén RAS aumenta el fenotipo bioenergético de la mitocondria en esta línea celular. De acuerdo con esta sugerencia, se observó que la oligomicina, un inhibidor de la fosforilación oxidativa, no tiene efecto significativo en las células controles (GFP), mientras que las células L10BIOBR Ras aumentan muy significativamente el flujo glucolítico tras el tratamiento con oligomicina (Figura 4.11 A). De hecho, alcanza el flujo glucolítico máximo de las células controles.

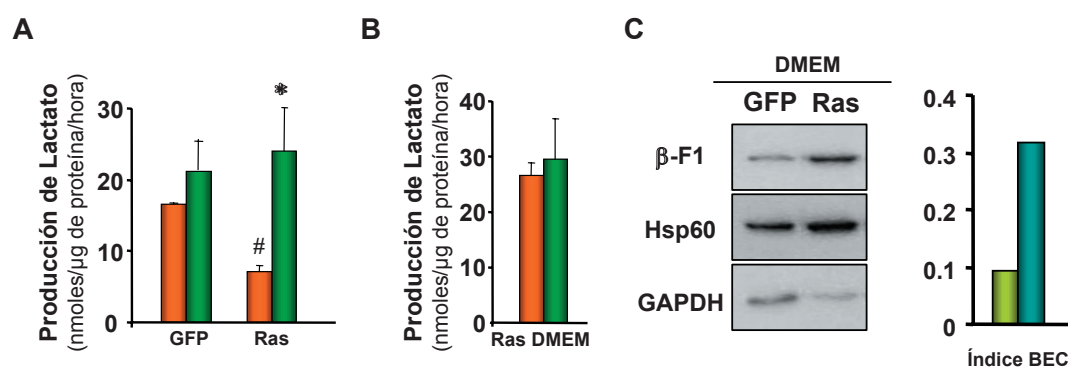


Figura 4.11. **El oncogén Ras aumenta el fenotipo bioenergético de la mitocondria en células L10BIOBR.** (A) Células L10BIOBR GFP y L10BIOBR Ras crecidas en medio Ham's se trataron en ausencia (■) o presencia (■) de oligomicina (6μM) durante 2 horas. Se realizó la medida del flujo glucolítico midiendo la producción de lactato de estas líneas celulares por microgramo de proteína celular y por hora. El histograma muestra la media ± S.E.M. de 3 experimentos. *, $P < 0,05$ al comparar frente a células no tratadas con el test de t de Student. #, $P < 0,05$ al comparar frente a células L10BIOBR GFP no tratadas con el test de t de Student. (B) Células L10BIOBR Ras crecidas en DMEM se trataron en ausencia (■) o presencia (■) de oligomicina (6μM) durante 2 horas. Se realizó la medida del flujo glucolítico midiendo la producción de lactato de estas líneas celulares por microgramo de proteína celular y por hora. El histograma muestra la media ± S.E.M. de 3 experimentos. (C) Muestras proteicas de células L10BIOBR GFP (■) y L10BIOBR Ras (■) se fraccionaron por SDS-PAGE y se incubaron con anticuerpos específicos contra los marcadores β -F₁-ATPasa, Hsp 60 y GAPDH. El índice BEC resulta de la normalización del índice mitocondrial de fosforilación β -F₁-ATPasa/Hsp60 con los niveles de expresión de la proteína glucolítica GAPDH.

Se ha descrito que el fenotipo metabólico de las células depende del medio en el que crecen (Rossignol y cols., 2004). Efectivamente, cuando las células L10BIOBR Ras fueron adaptadas a un medio rico en glucosa, como el DMEM que es 4 veces más rico en glucosa que el medio Ham's, se aprecia que el flujo glucolítico basal aumenta hasta

niveles máximos y no es significativamente diferente del flujo glucolítico en presencia de oligomicina (Figura 4.11 B) poniendo de manifiesto el efecto que el sustrato energético tiene sobre la funcionalidad de la mitocondria (Rossignol y cols., 2004). Sin embargo, cuando se compara el proteoma mitocondrial de las células L10BIOBR GFP y L10BIOBR Ras adaptadas a DMEM se observa que el potencial mitocondrial de las células con el oncogén Ras es 3 veces superior que el de las células controles GFP (Figura 4.11 C).

4.2.4. El oncogén EBV.

El virus Epstein-Bar (EBV), descubierto hace 40 años de biopsias de un linfoma de Burkitt, fue el primer virus que se asoció directamente con el cáncer humano (Young y Rickinson, 2004). EBV es un herpes-virus humano ubicuo asociado con el desarrollo de tumores linfoides y epiteliales. Como es común en las infecciones virales, EBV se aprovecha del proceso de desarrollo de la célula B para persistir de forma latente como infección asintomática. Sin embargo, el virus puede favorecer la oncogénesis como se evidencia por la frecuencia con la que se detecta en determinados tumores como el linfoma de Burkitt, linfomas de células B, la enfermedad de Hodgkin y el carcinoma nasofaríngeal (Young y Murray, 2003). También se ha descrito la capacidad de EBV para transformar eficientemente células B inmortalizándolas, dando lugar a las denominadas líneas celulares linfoblastoides (LCLs) (Young y Murray, 2003).

El estudio de este oncogén se ha realizado en la línea celular linfoblastoide LG2. En este caso concreto, el estudio no ha consistido en la comparación entre las células parentales y transformadas, sino en el estudio de posibles cambios en el fenotipo mitocondrial de la célula después de haber sido implantadas en ratones *nude* y que hayan generado los correspondientes tumores. El análisis del fenotipo mitocondrial por *Western-blot* revela una gran disminución en la razón β -F₁/Hsp60 y en el índice BEC en las células que se rescatan de los tumores (LG2AT) cuando se comparan con las células parentales (LG2BT) (Figura 4.12 A). Este resultado sugiere un proceso de selección “*in vivo*” de un fenotipo menos dependiente de la función bioenergética de la mitocondria para la progresión del tumor.

Con objeto de determinar este supuesto, se procedió a la determinación del flujo glucolítico de las células LG2BT y LG2AT que resultó infructuoso, posiblemente por tener muy poca dependencia de esta vía para obtener la energía metabólica. Por este motivo se determinó el consumo de oxígeno y se observó la práctica ausencia de respiración acoplada a la fosforilación oxidativa en ambas líneas celulares (Figura 4.12 B), lo que indica una fuerte independencia de las células LG2BT y LG2AT de la fosforilación oxidativa como vía de obtención de energía. Sin embargo, se apreció una disminución significativa en la respiración máxima de la línea celular rescatada de tumores (LG2AT) (Figura 4.12 B), lo que indica una alteración de la funcionalidad bioenergética de la mitocondria en esta línea cuando se compara con la línea parental LG2BT. Este resultado es compatible con la alteración del proteoma mitocondrial descrito en la Figura 4.12 A. Con objeto de verificar

RESULTADOS

este supuesto, se realizó un estudio por microscopía electrónica de la estructura de las mitocondrias en las líneas celulares LG2BT y LG2AT (Figura 4.12 C), así como un estudio de la expresión de las proteínas β -F₁-ATPasa y Hsp60 y de la razón β -F₁/Hsp60 por técnicas de inmunomicroscopía electrónica (Figura 4.12 C). Los resultados no muestran diferencias apreciables en la estructura de la mitocondria al comparar las líneas celulares LG2BT y LG2AT (Figura 4.12 C). Sin embargo, sí se observa que la expresión de la proteína β -F₁-ATPasa está significativamente reducida con respecto de la expresión de la proteína Hsp60 en la línea celular LG2AT (Figura 4.12 C). Estos resultados confirman que la progresión del tumor está ligada a un cambio en el fenotipo bioenergético de la mitocondria.

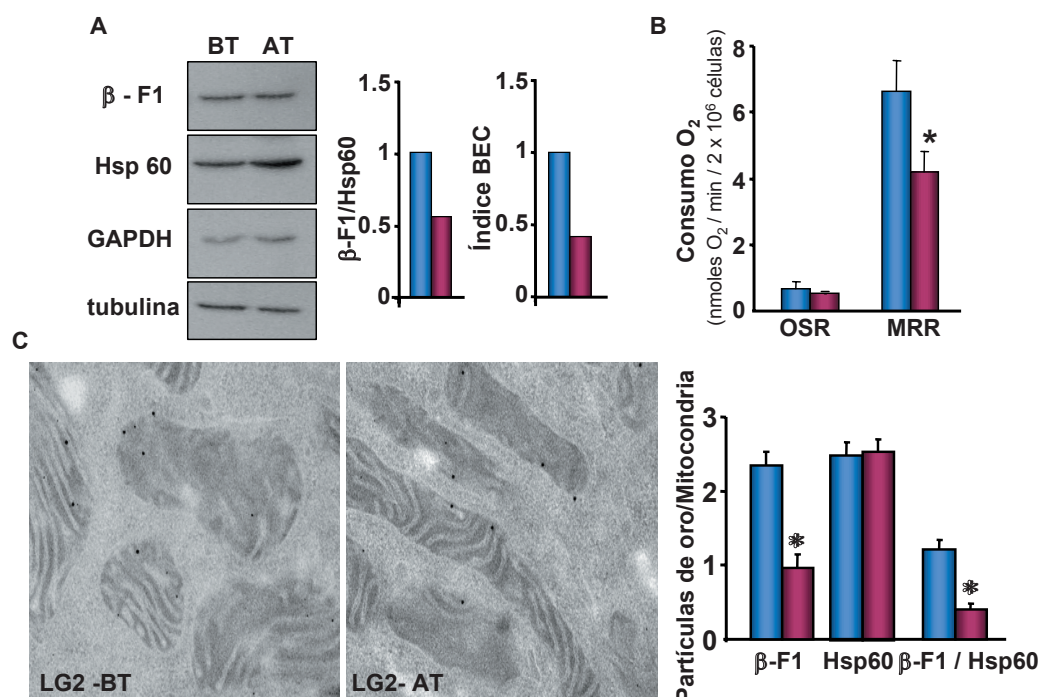


Figura 4.12. **La progresión del tumor está ligada a un cambio en el potencial bioenergético de la mitocondria.** (A) Muestras proteicas de células LG2BT y LG2AT se fraccionaron por SDS-PAGE y se incubaron con anticuerpos específicos contra los marcadores β -F₁-ATPasa, Hsp 60 y GAPDH. La carga diferencial entre las muestras se normalizó por tubulina. El cociente β -F₁/Hsp60 da una idea del potencial bioenergético de la mitocondria. El índice BEC resulta de la normalización del índice mitocondrial de fosforilación con los niveles de expresión de la proteína glucolítica GAPDH. (B) Medida del consumo de O₂ de células LG2BT y LG2AT. El histograma muestra la media \pm S.E.M. de 3 experimentos. *, P<0,05 al comparar frente a células LG2BT con el test de *t* de Student. MMR-Respiración máxima (+FCCP); OSR-Respiración sensible a oligomicina. (C) Caracterización mediante microscopía electrónica de la morfología de la mitocondria y estudio mediante inmunomarcaje de la expresión de β -F₁-ATPasa (oro coloidal 10nm) y Hsp60 (oro coloidal 15nm) en criosecciones de muestras de células LG2BT y LG2AT. El histograma muestra el porcentaje de inmunomarcaje en mitocondria. Los resultados muestran la media \pm S.E.M. del conteo en veinte inmunomicroscopías. *, P<0,05 al comparar frente a LG2BT con el test de *t* de Student. LG2BT (■) y LG2AT (■).

4.3. EL PAPEL DE LA H⁺-ATP SINTASA EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER.

En nuestro laboratorio hemos puesto de manifiesto la alteración del proteoma bioenergético de la mitocondria en diversos tumores humanos. En este objetivo nos planteamos cuál podría ser la ventaja que para las células tumorales supone el hecho de tener una función bioenergética disminuida, dicho de otra manera, cuál es el mecanismo de participación de la H⁺-ATP sintasa en la progresión del cáncer. La mitocondria desempeña un papel fundamental en la ejecución de la muerte celular (Wang, 2001). Así, se ha visto la importancia de la fosforilación oxidativa para una correcta ejecución de la apoptosis (Joshi y cols., 1999; Harris y cols., 2000; Dey y Moraes, 2000; Park y cols., 2004; Singh y Khar, 2005). Además, se ha mostrado que la actividad de la fosforilación oxidativa es requerida en levaduras en la toxicidad mediada por Bax (Harris y cols., 2000). De hecho, un estudio genético en levaduras permitió la identificación de una subunidad de la H⁺-ATP sintasa como un factor imprescindible en la muerte celular inducida por Bax (Gross y cols., 2000). Además, se ha descrito que la actividad de la H⁺-ATP sintasa es necesaria para la ejecución del programa de apoptosis (Matsuyama y cols., 1998), habiendo sugerido que participa produciendo la acidificación del citosol y la consiguiente activación de caspasas (Matsuyama y cols., 2000). Sin embargo, este trabajo ha sido muy criticado (Nicholls y cols., 2000). En concreto, en este objetivo, en colaboración con la Dra. Gema Santamaría de nuestro grupo, nos propusimos demostrar el mecanismo de participación de la H⁺-ATP sintasa en la muerte celular inducida por STS (Santamaria y cols., 2006).

4.3.1. La actividad de la H⁺-ATP sintasa es necesaria para una correcta ejecución de la apoptosis.

La muerte celular en células de hígado promovida por el tratamiento con estaurosporina (STS) se ejecuta vía mitocondria y participan mecanismos dependientes e independientes de caspasas (Chae y cols., 2000). En el modelo de células C9 de hígado de rata hemos mostrado que STS induce apoptosis vía mitocondrial promoviendo la salida de proteínas mitocondriales como citocromo c, AIF y EndoG y consecuentemente, la activación de caspasa 3 y la fragmentación del DNA nuclear (Santamaria y cols., 2006). De acuerdo con resultados previos (Matsuyama y cols., 1998; Matsuyama y cols., 2000; Shchepina y cols., 2002) hemos demostrado que la inhibición de la actividad de la H⁺-ATP sintasa con oligomicina, un inhibidor del flujo de H⁺ por el canal F₀ de dicho complejo, disminuye la muerte celular (Figura 4.13) retrasando la activación de caspasa 3 y la fragmentación de ADN (Santamaria y cols., 2006). Este resultado se confirmó con otro inhibidor de la H⁺-ATP sintasa que actúa por un mecanismo distinto. La aurovertina A se une específicamente a la región catalítica F₁-ATPasa de la H⁺-ATP sintasa inhibiendo su actividad (van Raaij y cols., 1996). Como se puede observar (Figura 4.13), el pre-tratamiento de células C9 con aurovertina A disminuye la muerte celular inducida por STS de forma similar a la oligomicina (Santamaria y cols., 2006).

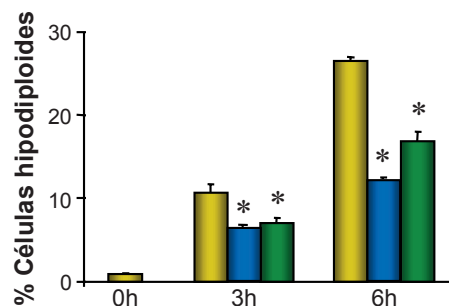


Figura 4.13. **La oligomicina y la aurovertina A retrasan la muerte celular inducida por estaurosporina.** Se trataron células C9 en ausencia o presencia de oligomicina (Ol) (6 μ M) o aurovertina A (Av) (20 μ M) durante 3 horas y a continuación se añadió \pm estaurosporina (St) (1 μ M) durante 3 y 6 horas (■ St, ■ Ol + St y ■ Av + St). La proporción de células con el DNA fragmentado (picos hipodiploides) se analizó mediante citometría de flujo. El histograma muestra la media \pm S.E.M. de 6 experimentos. *, $P < 0,05$ al comparar frente a las muestras +St con el test de t de Student.

Con el fin de excluir posibles efectos secundarios de la oligomicina en otras ATPasas celulares estudiamos el efecto de la oligomicina en la compartimentalización y emisión de fluorescencia del naranja de acridina (ver materiales y métodos 3.2.19). En células normales este fluoróforo se encuentra atrapado en su forma protonada dentro de gránulos celulares ácidos. La alta concentración del fluoróforo en estos orgánulos origina una emisión de señal roja (Figura 4.14) (Melnik y cols., 2001). La inhibición de ATPasas de estas organelas con bafilomicina B1, un inhibidor de ATPasas celulares no relacionadas con la H^+ -ATP sintasa mitocondrial (Bowman y cols., 1988), produce una alcalinización de dichos orgánulos lo que origina una neutralización del naranja de acridina permitiéndose así la salida del fluoróforo del orgánulo y la consiguiente pérdida de emisión de señal roja (Figura 4.14). Como puede apreciarse (Figura 4.14), la oligomicina no alteró la distribución subcelular del fluoróforo ni su emisión de fluorescencia. Además, y contrariamente al efecto observado para oligomicina y aurovertina A, el tratamiento de células C9 con bafilomicina B1 y STS produce un mayor porcentaje de muerte celular que células tratadas sólo con STS (Figura 4.14). Estos resultados sugieren que el efecto de la oligomicina sobre la muerte celular se produce por inhibición específica de la H^+ -ATP sintasa mitocondrial y no de otras ATPasas celulares.

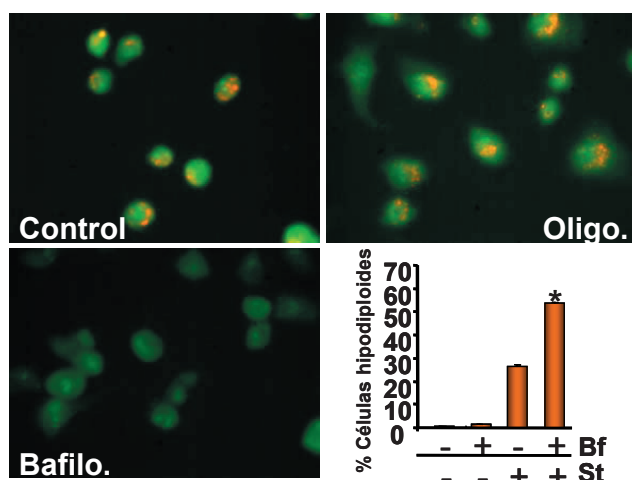


Figura 4.14. **La inhibición de otras ATPasas celulares intensifica la muerte celular inducida por estaurosporina.** Células C9 se trataron con bafilomicina B1 (Bafilo/Bf) (50nM) en ausencia o presencia de estaurosporina (St) (1 μ M) o con oligomicina (6 μ M). Las células se incubaron con 1 μ M de la sonda fluorescente naranja de acridina y se visualizaron por microscopía de fluorescencia. Se utilizó un aumento de 40x para tomar las fotografías. El histograma muestra la proporción de células con el DNA fragmentado (picos hipodiploides) medida mediante citometría de flujo. El histograma muestra la media \pm S.E.M. de 4 experimentos. *, $P < 0,05$ al comparar frente a las muestras +St con el test de t de Student.

4.3.2. Dinámica y morfología de la mitocondria en el proceso de muerte celular.

Los constituyentes moleculares que se encuentran implicados en la regulación de la morfología de la mitocondria juegan un papel importante en la ejecución de la muerte celular (von Ahsen y cols., 2000; Karbowski y cols., 2006), aunque parece que la contribución de esos cambios durante la apoptosis dependen de la señal inductora de muerte (Perfettini y cols., 2005). El tratamiento de las células con STS promueve como eventos más tempranos (i) un rápido (en menos de 10 minutos) desmantelamiento del retículo de mitocondrias, (ii) la migración de las mitocondrias fragmentadas hacia el núcleo de la célula y (iii) la fusión de las mismas en orgánulos de mayor diámetro, algo que se aprecia después de 60 minutos de inducir muerte (Figura. 4.15 A y video 1 en material suplementario). En la figura 4.15 A están representados diferentes fotogramas que ilustran los cambios producidos por STS en la red mitocondrial en células C9 que expresan establemente gfp en sus mitocondria (ver apartado 4.4.3). Como puede apreciarse (Figura 4.15 B), el tratamiento con oligomicina no afecta los cambios en el diámetro y morfología de las mitocondrias tras el tratamiento con STS, lo que indica que la actividad de la H^+ -ATP sintasa participa en muerte celular en un evento posterior a los cambios en la morfología de la mitocondria.

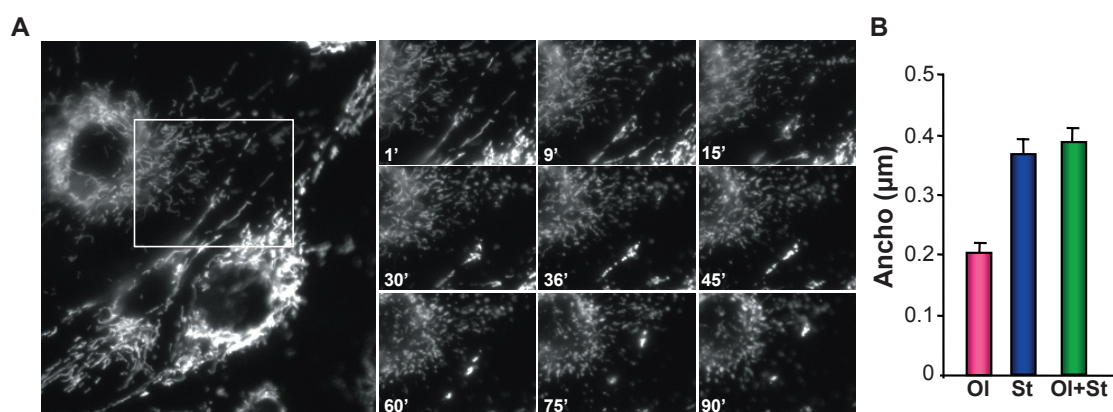


Figura 4.15. Cambios en la morfología mitocondrial después del tratamiento con estaurosporina. (A) Células C9 que expresan establemente gfp en sus mitocondrias (ver apartado 4.4.3) se trataron con estaurosporina (1μM) y se visualizaron y grabaron por microscopía de fluorescencia. Diferentes fotogramas de la película (ver material suplementario video 1) ilustran el rápido desmantelamiento de la red mitocondrial inducido por estaurosporina. (B) Se midió la sección mitocondrial de células C9 sometidas a diferentes tratamiento durante 3 horas: estaurosporina 1μM (St), oligomicina 6 μM (OI) y oligomicina más estaurosporina. El histograma representa la media ± S.E.M. de la medida de la sección mitocondrial de 10 mitocondrias/campo en al menos 10 campos de células elegidos al azar, de dos experimentos diferentes. El pre-tratamiento de las células con oligomicina no previene la fragmentación de las mitocondrias tras la inducción de muerte con estaurosporina.

4.3.3. La inhibición de la H^+ -ATP sintasa previene la salida de citocromo c de la mitocondria.

La permeabilización de la membrana externa mitocondrial permite la salida de proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria al citosol (Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003). Entre las proteínas liberadas de la mitocondria se encuentra citocromo c, cuya salida constituye un evento central en el programa de muerte celular programada por vía

mitocondrial. La salida de citocromo c dirige la formación del apoptosoma que finalmente resulta en la activación en cascada de caspasas y la salida de otras proteínas mitocondriales (Li y cols., 2004).

Una de las mayores controversias existentes en el proceso de apoptosis es la relación entre potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria y la salida de citocromo c (Rego y cols., 2001; Goldstein y cols., 2005). Es por ello que estudiamos el potencial de membrana mitocondrial cuando se induce apoptosis con STS en células C9. Como se puede observar en la figura 4.16 A, existe un rápido incremento del $\Delta\psi_m$ seguido de una pérdida posterior del $\Delta\psi_m$. Estos cambios en $\Delta\psi_m$ ocurren en ausencia de cambios en la fluorescencia de la sonda NAO, que mide la masa mitocondrial de la célula (Figura 4.16 B), lo que indica que los cambios en $\Delta\psi_m$, medidos con TMRM⁺, no están asociados a cambios en la masa mitocondrial y son realmente debidos a la hiperpolarización de la mitocondria. La inhibición de la H⁺-ATP sintasa con oligomicina, que previene la muerte celular (Figura 4.13), previene la hiperpolarización de la mitocondria en las células tratadas con STS (Figura 4.16 A). Este resultado sugiere la relevancia del aumento del $\Delta\psi_m$ en el proceso de muerte.

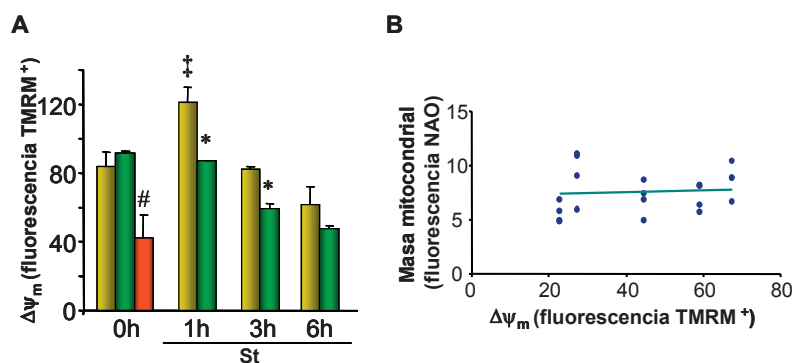


Figura 4.16. **La estaurosporina promueve una hiperpolarización del $\Delta\psi_m$.** (A) Células C9 se trataron en ausencia o presencia de oligomicina (Ol) (6 μ M) durante 3 horas y a continuación se añadió \pm estaurosporina (St) (1 μ M) (■ St y ■ Ol. + St). Se realizó la determinación de $\Delta\psi_m$ mediante citometría de flujo utilizando la sonda TMRM⁺. Se midió también el $\Delta\psi_m$ en células tratadas con el desacoplante FCCP (50 μ M) durante 30 minutos (■). El histograma muestra la media \pm S.E.M. de 6 experimentos. *, P<0,05 al comparar frente a las muestras +St con el test de *t* de Student, # y ‡, P<0,05 al comparar frente a células no tratadas (0h). (B) Se realizó la determinación simultánea mediante citometría de flujo del $\Delta\psi_m$ (TMRM⁺) y de la masa mitocondrial celular (NAO) en células C9 tratadas con St 6 μ M a distintos tiempos (0-6h). Los datos se ajustan a una recta paralela al eje de fluorescencia TMRM⁺, lo que indica que los cambios en $\Delta\psi_m$ no se deben a cambios en la masa mitocondrial.

El tratamiento de células C9 con STS produce salida de citocromo c, activación de caspasa 3 y fragmentación del DNA nuclear (Santamaria y cols., 2006). La salida de citocromo c se inicia a los 90 minutos de la inducción de muerte celular con STS (Figura 4.17), cuando los cambios morfológicos en la red mitocondrial ya han tenido lugar (Figuras 4.15 y video 1 en material suplementario) y la mitocondria se ha hiperpolarizado (Figura 4.16 A). La inhibición de la H⁺-ATP sintasa con oligomicina produce un retraso significativo en la salida de citocromo c (Figura 4.17), produciéndose de forma congruente un retraso en la activación de caspasa 3 y en la muerte celular (Santamaria y cols., 2006).

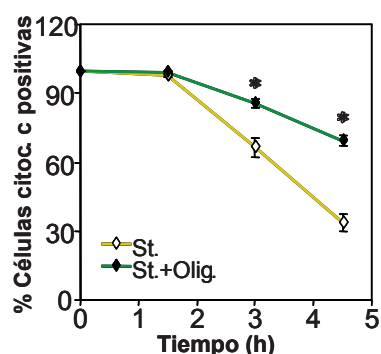


Figura 4.17. **La oligomicina retrasa la salida de citocromo c promovida por estaurosporina.** Células C9 se trataron en ausencia o presencia de oligomicina (Ol) (6 μ M) durante 3 horas y a continuación se añadió \pm estaurosporina (St) (1 μ M). Las células se analizaron por microscopia de fluorescencia usando un anticuerpo anti-citocromo c, que reconoce la forma nativa mitocondrial, a distintos tiempos de tratamiento con estaurosporina. La fragmentación del DNA se estudió con la sonda nuclear ToPro. Los resultados muestran media \pm S.E.M. de la cuantificación del porcentaje de células citocromo c positivas en 20 campos de 3 experimentos. *, $P < 0,05$ al comparar frente a las muestras +St con el test de t de Student.

Son muchos los estudios que implican la actividad del poro de permeabilización transitorias (PTP) en la salida de citocromo c durante el proceso de apoptosis (Walter y cols., 1998; Pagano y cols., 2004), incluso, se ha sugerido que la H⁺-ATP sintasa podría estar implicada en la salida de proteínas mitocondriales a través del complejo PTP (Narita y cols., 1998). Este hecho parece no producirse en nuestro sistema experimental puesto que la inhibición del complejo PTP con ciclosporina A, un potente inhibidor de la ciclofilina D componente de este poro (Broekemeier y cols., 1989), no previene la salida de citocromo c en células tratadas con STS (Figura 4. 18 A y B). Además, la inhibición de PTP con ciclosporina A no previno la muerte celular inducida con STS (Fig. 4. 18 A y C) como era

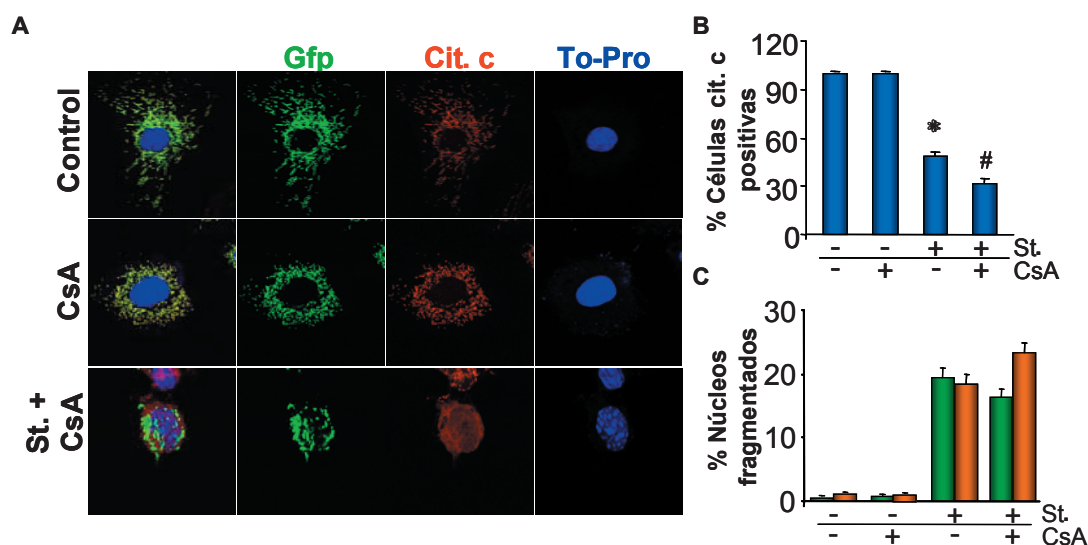


Figura 4.18. **La inhibición de MTP no previene ni la salida de citocromo c ni la muerte celular.** Células C9 que expresan establemente gfp en sus mitocondrias se trataron en ausencia o presencia de ciclosporina A (CsA) (1 μ M) durante 3 horas y a continuación se añadió \pm estaurosporina (St.) (1 μ M) durante 3 horas. (A) Las células se analizaron por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico anti-citocromo c que reconoce la forma nativa mitocondrial. El DNA nuclear se tiñó con la sonda ToPro. (B) El histograma muestra la proporción de células citocromo c positivas, que mantiene el citocromo c en las mitocondrias, medida por inmunofluorescencia. Los resultados muestran media \pm S.E.M. de la cuantificación del porcentaje de células citocromo c positivas en 20 campos de 2 experimentos. *, $P < 0,05$ al comparar frente a células no tratadas, #, $P < 0,05$ al comparar frente a células tratadas con St con el test de t de Student. (C) El histograma muestra la proporción de células con el DNA fragmentado medido mediante citometría de flujo (picos hipodiploides) (■) o mediante microscopia de fluorescencia mediante la tinción del núcleo con la sonda ToPro (■). El histograma muestra la media \pm S.E.M. de 3 experimentos.

de esperar al no bloquear la salida de citocromo c de la mitocondria. Cabe destacar que el tratamiento de las células con ciclosporina A promueve cambios en la morfología de la mitocondria existiendo una mayor proporción de mitocondrias fisionadas que no forman una red mitocondrial (Figura 4.18 A).

4.3.4. La actividad de la H^+ -ATP sintasa controla la producción de especies reactivas de oxígeno en respuesta a STS.

El transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial está normalmente acoplado a la fosforilación oxidativa. Este transporte, dependiendo del tipo celular y de las condiciones del momento, no es 100% eficiente escapando electrones de la cadena respiratoria originándose los radicales de oxígeno (St-Pierre y cols., 2002; Lambert y Brand, 2004). El tratamiento de células C9 con STS promueve un rápido incremento en la producción de radicales de oxígeno (Figura 4.19 A) (Santamaria y cols., 2006). La inhibición del complejo I de la cadena respiratoria con rotenona y la inhibición de la H^+ -ATP sintasa con oligomicina bloquean el incremento de radicales de oxígeno generados por STS (Figura 4.19 A) (Santamaria y cols., 2006). La producción de radicales de oxígeno depende del potencial de membrana mitocondrial (Korshunov y cols., 1997; Votyakova y Reynolds, 2001; Miwa y Brand, 2003), por ello, estudiamos la dependencia de la producción de radicales de oxígeno con el $\Delta\psi_m$ a tiempos cortos de tratamiento con STS porque habíamos visto la hiperpolarización de la mitocondria (Figura 4.16). Como se puede observar en la figura 4.19 B la titulación de $\Delta\psi_m$ con FCCP, que promueve la disipación del potencial de membrana, resulta en una reducción dosis-dependiente de la producción de ROS, en concreto de H_2O_2 , lo que sugiere que la hiperpolarización tras el tratamiento con STS es la responsable de la generación de una señal de ROS como señal temprana de muerte.

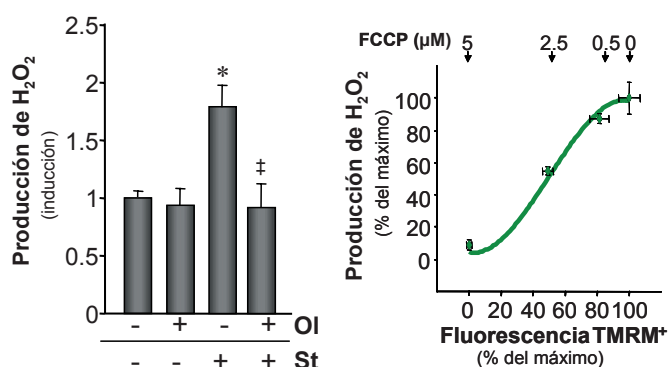


Figura 4.19. El $\Delta\psi_m$ controla la producción de especies reactivas de oxígeno. (A) Células C9 se trataron en ausencia o presencia de oligomicina (Ol) (6μ M) durante 3 horas y a continuación se añadió \pm estaurosporina (St) (1μ M) durante 90 minutos y se determinó por citometría de flujo la producción de H_2O_2 . Los resultados muestran media \pm S.E.M. de 3 experimentos. *, $P<0,05$ al comparar frente a células no tratadas, ‡, $P<0,05$ al comparar frente a células tratadas con St con el test de t de Student. (B) Células C9 inducidas a muerte celular con estaurosporina (1μ M) se pre-trataron durante 30 minutos con diferentes concentraciones de FCCP. Las células se analizaron a los 90 minutos por citometría de flujo para la determinación en paralelo del $\Delta\psi_m$ y de la producción de H_2O_2 . Los resultados muestran media \pm S.E.M de 7 experimentos y se expresan como el porcentaje con respecto al máximo de fluorescencia para cada una de las sondas utilizadas.

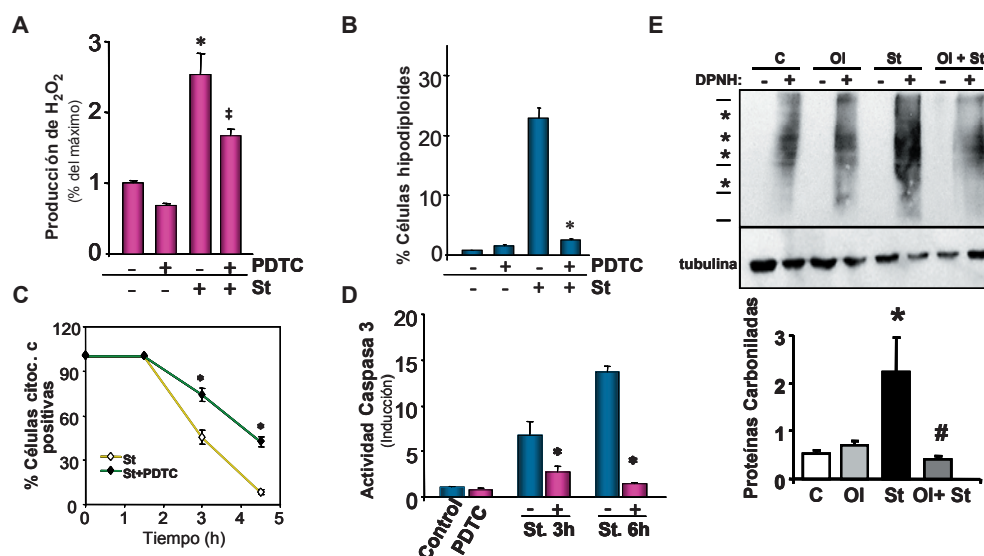


Figura 4.20. **La neutralización de radicales de oxígeno previene la muerte celular inducida por estaurosporina.** Células C9 se trataron, o no, con el antioxidante PDTC (10 μ M) durante 30 minutos y a continuación se añadió \pm estaurosporina (St) (1 μ M). **(A)** Las células se analizaron a los 90 minutos por citometría de flujo para la determinación de la producción de H₂O₂. Los resultados muestran media \pm S.E.M. de 7 experimentos. *, P<0,05 al comparar frente a células no tratadas, ‡, P<0,05 al comparar frente a células tratadas con St con el test de *t* de Student. **(B)** El histograma muestra la proporción de células con el DNA fragmentado (picos hipodiploides) medida por citometría de flujo. Los resultados muestran la media \pm S.E.M. de 6 experimentos. *, P<0,05 al comparar frente a las muestras tratadas con St con el test de *t* de Student. **(C)** Las células se analizaron por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico anti-citocromo c, que reconoce la forma nativa mitocondrial. El DNA nuclear se tiñó con la sonda ToPro. El histograma muestra la proporción de células citocromo c positivas medidas mediante inmunofluorescencia positiva en las mitocondrias. Los resultados muestran media \pm S.E.M. de la cuantificación del porcentaje de células citocromo c positivas en 20 campos de 3 experimentos. *, P<0,05 al comparar frente a las muestras tratadas con St con el test de *t* de Student. **(D)** Estudio del efecto de PDTC en la activación de caspasa 3 a diferentes tiempos tras la activación a muerte con St. Los resultados muestran la media \pm S.E.M. de 4 experimentos. *, P<0,05 al comparar frente a las muestras tratadas con St. con el test de *t* de Student. **(E)** Células C9 se trataron, o no, con oligomicina (OI) (6 μ M) durante 3 horas y a continuación se añadió \pm estaurosporina (St) (1 μ M). Extractos de proteína celular (20 μ g) se derivatizaron en presencia o ausencia de DPNH y se procesaron para la identificación de grupos carbonilos de proteínas. La carga de las muestras se verificó mediante Western-blot de tubulina. La masa molecular del marcador se muestra a la izquierda de la imagen (97, 66, 45 y 30 kDa). Los asteriscos señalan cuatro proteínas que se usaron en la cuantificación de la carbonilación de proteínas en los distintos tratamientos. El histograma muestra la media \pm S.E.M. de 3 experimentos. *, P<0,05 al comparar frente a células no tratadas, #, P<0,05 al comparar frente a células tratadas con St al comparar con el test de *t* de Student.

Una vez que hemos demostrado que la H⁺-ATP sintasa participa en la generación de especies reactivas de oxígeno tras el tratamiento de las células con STS (Santamaria y cols., 2006), nos preguntamos cuál era la relación entre la producción de radicales de oxígeno y la ejecución de la muerte celular. Para ello, se estudió el efecto de varios antioxidantes en muerte celular. De todos los antioxidantes ensayados (Vitamina E, Glutation, Trolox, MnTBAP, Ebselen, N-Ac-Cys) únicamente pirrolidina ditiocarbamato, PDTC (Orrenius y cols., 1996; Zhu y cols., 2002) y el ascorbato (en menor medida) neutralizan parcialmente los radicales de oxígeno generados por la mitocondria después del tratamiento con STS (Figura 4.20 A y datos no mostrados) produciéndose la inhibición de la muerte celular en estas circunstancias (Figura 4.20 B). Además, se observa un retraso significativo en la

salida de citocromo c en células tratadas con PDTC inducidas a muerte celular con STS (Figura 4.20 C). De forma consistente con estos resultados, PDTC inhibe la activación de caspasa 3 en células tratadas con STS (Figura 4.20 D).

Uno de los efectos negativos de los ROS es la modificación covalente de proteínas. El tratamiento de las células con STS promovió un incremento en la carbonilación de algunas proteínas celulares en células C9 (Figura 4.20 E). La incubación de las células con oligomicina previno la oxidación de las proteínas inducida por STS (Figura 4.20 E) indicando una vez más la importancia de la actividad de la H^+ -ATP sintasa en la generación de una señal temprana de ROS y con efectos directos en la modificación covalente de proteínas celulares.

4.4. BIOGÉNESIS Y DINÁMICA MITOCONDRIAL DURANTE EL CICLO CELULAR.

La proliferación celular requiere una abundante provisión de energía para abastecer los requerimientos energéticos que suponen la remodelación de la cromatina, del citoesqueleto y de los orgánulos, así como otras funciones específicas del ciclo. La mitocondria juega un papel importante en la provisión de la energía metabólica. Sin embargo, los conocimientos sobre la biosíntesis de componentes mitocondriales y los mecanismos que regulan la síntesis de las proteínas implicadas en la transducción de energía durante el ciclo celular son muy escasos. Además, los aspectos celulares de los cambios en la morfología y el dinamismo de las mitocondrias que inciden en la función y la segregación de las mitocondrias durante la mitosis están poco estudiados. Por ello, en este objetivo nos planteamos el estudio de estos aspectos de la biología de la mitocondria durante la progresión celular.

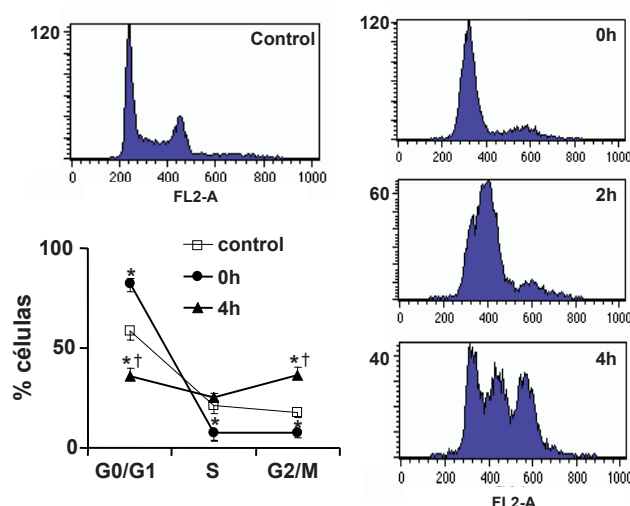


Figura 4.21. **Análisis de la sincronización de células C9.** Células C9 se sincronizaron mediante doble arresto metabólico. Se analizó el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular mediante citometría de flujo. Los paneles muestran perfiles representativos del ciclo celular de células control, células sincronizadas (0h) y células a distintos tiempos tras eliminar el agente bloqueante (2h y 4h). La gráfica representa el análisis de la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo de 5 experimentos de sincronización independientes y de 3 muestras control no sincronizadas. Los resultados muestran la media \pm S.E.M. * y †, $P < 0,05$ al comparar frente células control y células sincronizadas (0h), respectivamente, con el test de t de Student.

4.4.1. Biogénesis y diferenciación de la mitocondria durante el ciclo celular.

Se sincronizaron células de hígado de rata (C9) mediante doble arresto metabólico en la frontera de la fase S del ciclo celular. El arresto del ciclo produce un aumento muy

significativo en la proporción de células en fase G_0/G_1 (Figura 4.21). Por otro lado, la eliminación del bloqueo produce una disminución significativa en el número de células en G_0/G_1 siendo el porcentaje de células a las 4 horas de la eliminación del bloqueo muy similar en las distintas fases del ciclo celular (Figura 4.21). Se determinó el contenido relativo de mtDNA y la expresión del contenido de proteínas de la mitocondria a distintos tiempos tras la eliminación del bloqueo (0-10 horas) (Figura 4.22). La determinación del contenido celular relativo de mtDNA se expresó por el gen mitocondrial 12S rRNA respecto de la representación del gen nuclear β -F₁-ATPasa (Figura 4.22 A). Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas en esta razón durante la progresión del ciclo celular (Figura 4.22 A), lo que sugiere que ambos genomas se replican simultáneamente.

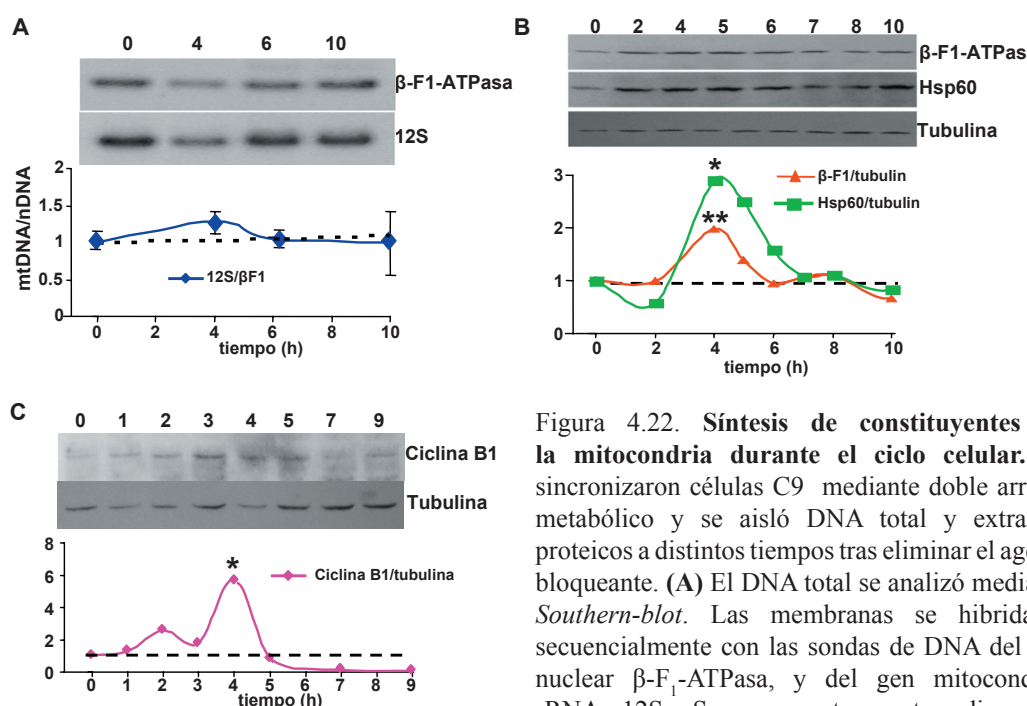


Figura 4.22. **Síntesis de constituyentes de la mitocondria durante el ciclo celular.** Se sincronizaron células C9 mediante doble arresto metabólico y se aisló DNA total y extractos proteicos a distintos tiempos tras eliminar el agente bloqueante. (A) El DNA total se analizó mediante *Southern-blot*. Las membranas se hibridaron secuencialmente con las sondas de DNA del gen nuclear β -F₁-ATPasa, y del gen mitocondrial rRNA 12S. Se representan autorradiografías

representativas de cada hibridación. Los resultados muestran la media \pm S.E.M. de 2 experimentos. (B) Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western-blot*. Las membranas se hibridaron secuencialmente con los anticuerpos de las proteínas mitocondriales β -F₁-ATPasa y Hsp60 y (C) con el anticuerpo de la proteína ciclina B1. La carga diferencial entre las muestras se normalizó por tubulina. Los resultados muestran un experimento representativo de 4 y 3 experimentos similares respectivamente. * y **, $P < 0,05$ y $< 0,005$ al comparar frente a 0-2 horas con el test de *t* de Student.

Contrariamente a lo obtenido para el DNA mitocondrial, se observó que el contenido celular relativo de la proteína mitocondrial β -F₁-ATPasa (expresado por el cociente β -F₁-ATPasa/tubulina) muestra un incremento significativo de dos veces a las cuatro horas de reiniciado el ciclo celular (Figura 4.22 B). Se obtuvo un resultado similar, pero con un incremento aún mayor, para el contenido relativo celular de otra proteína mitocondrial, Hsp60 (Figura 4.22 B). Estos resultados sugieren la existencia de una fase del ciclo celular donde se produce la síntesis preferencial de proteínas mitocondriales. La ciclina B1 es la subunidad reguladora de la proteína quinasa Cdc2 que es específica de la fase M del ciclo

RESULTADOS

celular (Murray y Kirschner, 1989). El análisis de los niveles de expresión de ciclina B1 reveló un incremento significativo de esta proteína a las 4 horas después de iniciado el ciclo (Figura 4.22 C), lo que sugiere que la síntesis preferencial de las proteínas mitocondriales (Hsp60/ β -F₁-ATPasa) tiene lugar en la fase de mitosis.

La acumulación preferencial de β -F₁-ATPasa y Hsp60 en G₂/M se confirmó mediante el análisis del contenido de estas proteínas por técnicas de citometría de flujo (Figuras 4.23 y 4.24). En la figura 4.23 se muestran los controles de citometría con objeto de ilustrar la especificidad del inmunomarcaje, así como un experimento representativo de la señal de fluorescencia en las células en función de la fase del ciclo en que se encuentran para cada uno de los marcadores estudiados. La figura 4.24 A muestra la intensidad de fluorescencia media por célula de distintas proteínas mitocondriales en las distintas fases del ciclo celular identificadas éstas por la cantidad de su contenido en DNA. Como se puede observar (Figura 4.24 A), las proteínas β -F₁-ATPasa, Hsp60 y las subunidades COXI y COXIV de la cadena respiratoria duplican su cantidad en el ciclo, sin embargo, el análisis reveló un incremento significativo de la proteína β -F₁-ATPasa en la fase G₂/M cuando se comparó frente a células en fases G₀/G₁ y S (Figura 4.24 A). Este mismo resultado se obtuvo cuando realizamos el estudio con la proteína Hsp60 (Figura 4.24 A). Por contra, no se observaron cambios significativos en la expresión de las proteínas mitocondriales COX I y COX IV entre la fase S y G₂/M del ciclo celular (Figura 4.24 A).

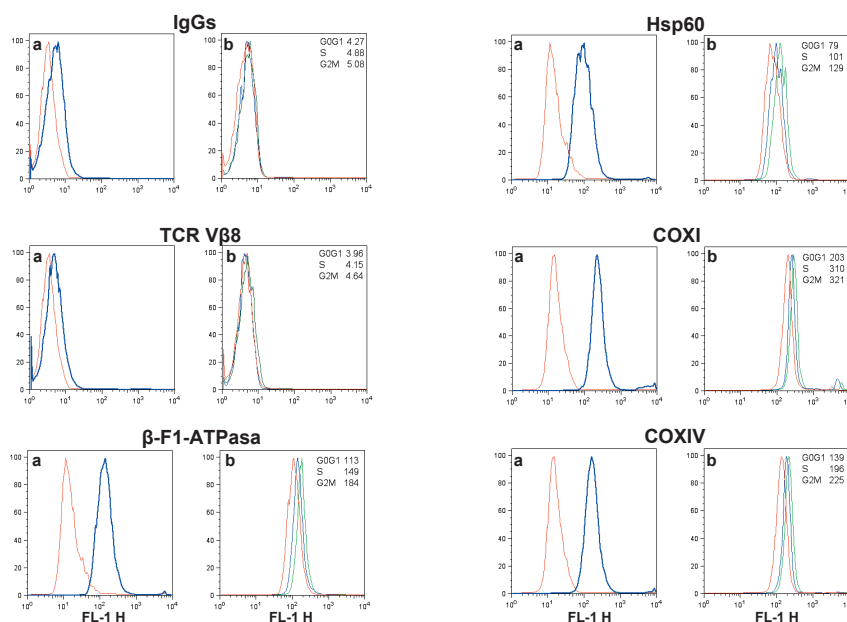


Figura 4.23. **Acumulación de proteínas mitocondriales durante el ciclo celular.** La determinación de los niveles de expresión de proteínas mitocondriales se llevó a cabo mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos frente a β -F₁ ATPasa, Hsp60, COXI y COXIV. Anticuerpos no relevantes contra isotipos específicos de IgGs y contra el complejo del receptor de células T (TCR Vβ8) se utilizaron como control. Los histogramas en (a) muestran el solapamiento de la señal de intensidad de fluorescencia de cada uno de los anticuerpos utilizados (azul) con la señal del anticuerpo secundario (rojo) en toda la población celular analizada. Los histogramas en (b) muestran la señal de cada anticuerpo utilizado en células en fases G₀/G₁ (rojo), S (azul) y G₂/M (verde) del ciclo celular discriminadas mediante tinción con yoduro de propidio. Se muestra la intensidad de fluorescencia media para cada población subcelular.

Con objeto de confirmar estos resultados, se procedió a la separación de células en las diferentes fases del ciclo celular mediante citometría de flujo, determinándose la expresión de las proteínas en los extractos proteicos por *Western-blot*. La figura 4.24 B muestra que la expresión de β -F₁-ATPasa no varía respecto de Hsp60 en las distintas fases del ciclo celular (estimado por la razón β -F₁/Hsp60). Por contra, se observa un aumento significativo de la expresión de las proteínas mitocondriales β -F₁-ATPasa (Figura 4.24 B) y Hsp60 (datos no mostrados) frente a proteínas de la cadena respiratoria (COX IV) en fase G₂/M del ciclo (Figura 4.24 B). En su conjunto, estos resultados confirman que un gran porcentaje de la proteína β -F₁-ATPasa está siendo sintetizada en la fase G₂/M del ciclo de acuerdo con lo descrito en células sincronizadas (Figura 4.22 B).

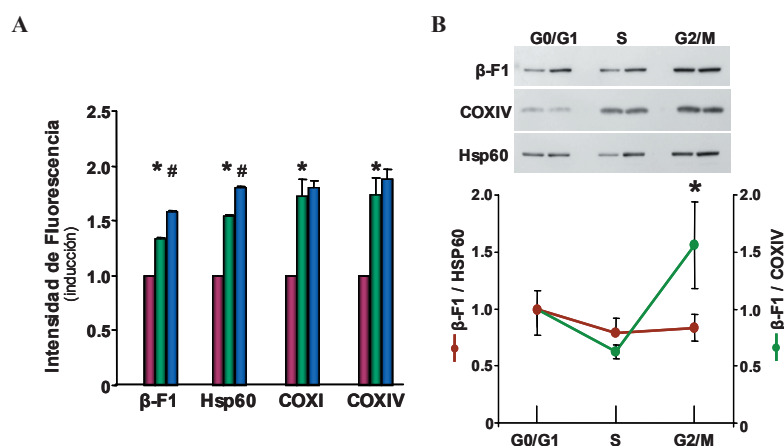


Figura 4.24. **Síntesis preferencial de β -F₁-ATPasa y Hsp60 en fase M del ciclo celular.** (A) Estudio del contenido de proteínas mitocondriales (β -F₁-ATPasa, Hsp60, COXI y COXIV) en las diferentes fases del ciclo celular (■ G₀/G₁, ■ S y ■ G₂/M) mediante citometría de flujo. Los resultados muestran la media \pm S.E.M. de 5 experimentos. *, P<0,05 al comparar frente a fase G₀/G₁ y #, P<0,05 al comparar frente a fase S con el test de *t* de Student. (B) Se separaron células C9 mediante citometría de flujo en las diferentes fases del ciclo celular y posteriormente se analizaron mediante *Western-blot*. Las membranas se hibridaron secuencialmente con los anticuerpos de las proteínas mitocondriales β -F₁-ATPasa, Hsp60 y COXIV. Se representan autorradiografías representativas de cada hibridación. Los resultados muestran la media \pm S.E.M. de 4 experimentos. *, P<0,05 al comparar frente a fase S con el test de *t* de Student.

Asimismo, estudiamos con dos sondas fluorescentes diferentes la síntesis de membrana interna (NAO) y la diferenciación funcional de la mitocondria (TMRM⁺) durante el ciclo celular. El fluoróforo NAO se une específicamente a fosfolípidos cargados negativamente con una afinidad por cardiolipina 30 veces superior que por fosfatidilserina y fosfatidilinositol (Leprat y cols., 1990), lo que permite la cuantificación de fosfolípidos de membrana interna y por tanto, da una idea de la masa mitocondrial de la célula. La sonda TMRM⁺ nos proporciona la medida del potencial de membrana mitocondrial y en consecuencia nos permite conocer el estado funcional del orgánulo. Como se puede observar (Figura 4.25), la intensidad de fluorescencia por célula de NAO y TMRM⁺ aumenta significativamente en fase S cuando se compara con la intensidad de fluorescencia en fase G₀/G₁. Sin embargo, mientras que la intensidad de fluorescencia de la señal de TMRM⁺

RESULTADOS

incrementa significativamente entre la fase S y G2/M (Figura 4.25 B), la señal de NAO no experimenta ningún cambio (Figura 4.25 A). Estos resultados sugieren que la biosíntesis del fosfolípido cardiolipina de la membrana interna mitocondrial se completa en la fase S del ciclo celular, mientras que la diferenciación funcional de la mitocondria, medida por el desarrollo máximo de su potencial de membrana, requiere de eventos adicionales que ocurren en la fase G2/M del ciclo.

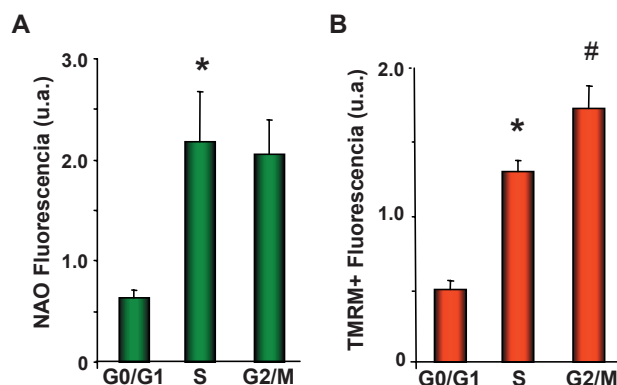


Figura 4.25. **Biogénesis y diferenciación mitocondrial en el ciclo celular.** Células C9 se analizaron por citometría de flujo para la determinación en paralelo de la masa mitocondrial (sonda NAO) (A) y del potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) (sonda TMRM⁺) (B) en las distintas fases del ciclo celular. Los resultados muestran la media \pm S.E.M de 6 experimentos. *, $P < 0,05$ al comparar frente a fase G₀/G₁ y #, $P < 0,05$ al comparar frente a fase S con el test de *t* de Student.

4.4.2. Control de la síntesis de β -F₁-ATPasa durante el ciclo celular.

Nuestro grupo ha descrito que la regulación de la traducción del mRNA de β -F₁-ATPasa (β -mRNA) es esencial en los procesos de diferenciación mitocondrial que se dan en el desarrollo del hígado (Luis y cols., 1993; Izquierdo y cols., 1995; Cuezva y cols., 1997; Cuezva y cols., 1997) así como en cáncer (Cuezva y cols., 1997; López de Heredia y cols., 2000). En este sentido, hemos mostrado que el β -mRNA se encuentra formando parte de un complejo ribonucleoproteico en hepatocitos de rata (Ricart y cols., 1997; Egea y cols., 1997). La traducción de β -mRNA requiere de dos secuencias posicionadas en extremos distales del mensajero: una denominada β 1.2, localizada en la región codificante y la secuencia 3' no traducible (3'UTR) del mensajero (Ricart y cols., 2002). La traducción del β -mRNA es, en gran medida, dependiente de la región 3'UTR (Izquierdo y Cuezva, 1997) que constituye un elemento regulador positivo de la traducción del mensajero ya que tiene la capacidad de interactuar directamente con la maquinaria de traducción (Izquierdo y Cuezva, 1997) funcionando como un elemento de iniciación interna de la traducción (IRES) (Di Liegro y cols., 2000; Izquierdo y Cuezva, 2000). La represión de la traducción del β -mRNA, que ocurre tanto en hígado fetal (Izquierdo y Cuezva, 1997) como en hepatomas (López de Heredia y cols., 2000), está ocasionada por la unión de proteínas a la región 3'UTR (3' β FBPs) (Izquierdo y Cuezva, 1997; López de Heredia y cols., 2000) que interfieren en su actividad intensificadora de la traducción.

Por este motivo, nos interesó conocer si el aumento en la expresión de β -F₁-ATPasa en G₂/M estaba causado por cambios en los niveles del mRNA en esta fase del ciclo celular. Para ello, se sincronizaron cultivos de C9 y se determinó el contenido relativo celular de β -mRNA a distintos tiempos tras eliminar el agente bloqueante (0-10 horas). Debemos

resaltar la ausencia de cambios significativos en la cantidad relativa celular de β -mRNA (razón β -F₁/18S) durante el ciclo celular (Figura 4.26). Además, los niveles estacionarios de β -mRNA normalizados por las correspondientes señales de hibridación del rRNA mitocondrial 12S y del mRNA de ATPasa 6-8 tampoco muestran cambios significativos a lo largo del ciclo celular (Figura 4.26). Estos resultados indican la ausencia de una transcripción/estabilización preferencial del gen de β -F₁-ATPasa en la fase de mitosis del ciclo celular, y sugieren que la acumulación de proteína β -F₁-ATPasa en G₂/M está regulada por cambios en la eficiencia de traducción del transcrito. Además, estos resultados sugieren que la transcripción de los genes nucleares y mitocondriales del complejo de la H⁺-ATP sintasa está coordinada durante el ciclo celular.

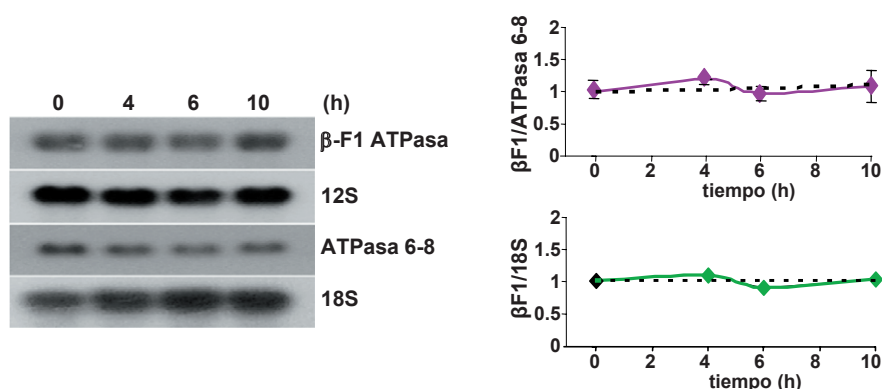


Figura 4.26. El mRNA de β -F₁-ATPasa no presenta cambios en su expresión durante el ciclo celular. Se sincronizaron células C9 mediante doble arresto metabólico y se aisló RNA total a distintos tiempos tras eliminar el agente bloqueante que se procesó mediante *Northern-blot*. Las membranas se hibridaron secuencialmente con las sondas de cDNA de los genes β -F₁-ATPasa, 12S, 18S y ATPasa 6-8. Se representan autorradiografías representativas de cada hibridación. Los resultados muestran la media \pm S.E.M. de 2 experimentos.

Con el fin de verificar el posible control de la traducción de β -mRNA en G₂/M se estudió la expresión de la proteína “reportera” gfp derivada de un mRNA quimera que contiene la región 3’UTR reguladora de la traducción de β -mRNA (Izquierdo y Cuezva, 1997; Di Liegro y cols., 2000; Izquierdo y Cuezva, 2000). La descripción de los resultados correspondientes a las células que expresan gfp en sus mitocondrias se hace en el epígrafe 4.4.3. Debemos resaltar que estas células estables se hicieron dirigiendo la proteína gfp a la mitocondria con objeto de evitar su toxicidad celular (Di Liegro y cols., 2000).

Coherentemente, el análisis de la expresión de gfp (razón gfp/tubulina) en células C9-p β gfp3’ β no sincronizadas, revela la ausencia de cambios en la expresión relativa de gfp durante la proliferación celular (Figura 4.27 A). Por el contrario, el mismo análisis realizado en células C9-p β gfp3’ β sincronizadas reveló una acumulación preferencial y significativa de gfp a 4 horas tras la eliminación del bloqueo (Figura 4.27 B), es decir, en el momento del ciclo que coincide con la fase G₂/M (Figura 4.22 C). Se ha descrito que el promotor del citomegalovirus, que es el promotor de la construcción que hemos utilizado para la generación de la línea estable, está regulado durante el ciclo celular (Brightwell y cols.,

RESULTADOS

1997). Sin embargo, el contenido celular relativo del mRNA de *gfp* en células C9-p β gfp3' β sincronizadas no muestra cambios significativos tras eliminar el agente bloqueante (Figura 4.27 C). Estos resultados indican la ausencia de una regulación ciclo celular dependiente del promotor de citomegalovirus y apoyan que la síntesis preferencial de *gfp* en la fase G₂/M está controlada por un aumento de la traducción de su mensajero controlada por la secuencia 3'UTR.

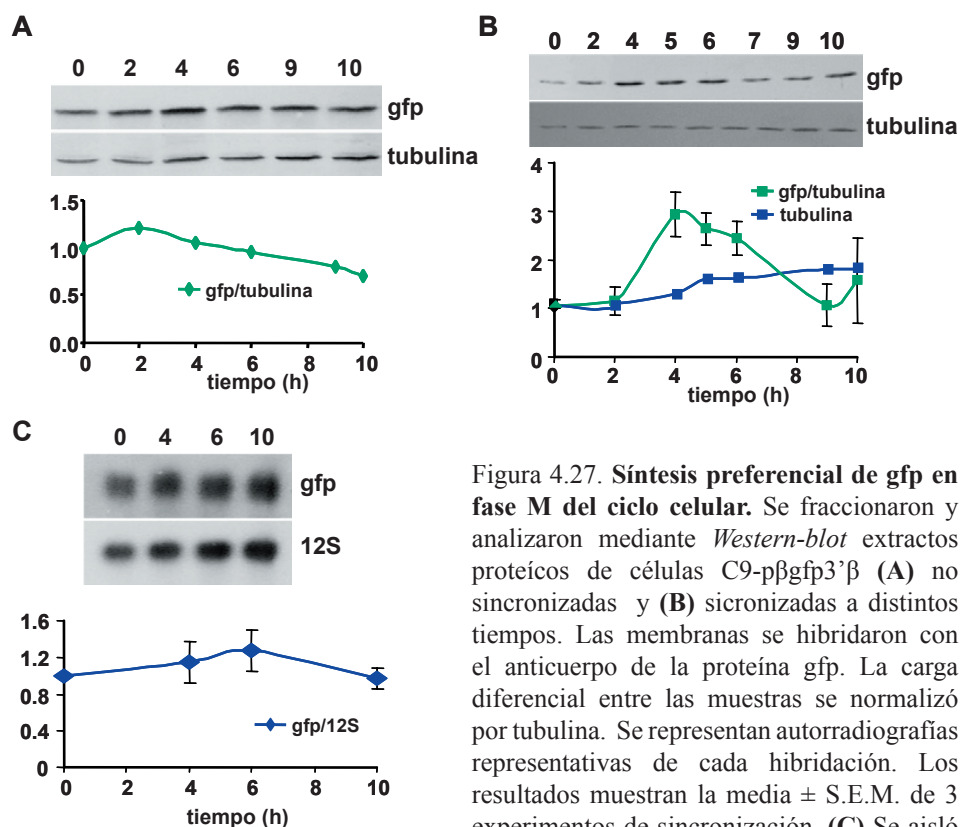


Figura 4.27. **Síntesis preferencial de *gfp* en fase M del ciclo celular.** Se fraccionaron y analizaron mediante *Western-blot* extractos proteicos de células C9-p β gfp3' β (A) no sincronizadas y (B) sincronizadas a distintos tiempos. Las membranas se hibridaron con el anticuerpo de la proteína *gfp*. La carga diferencial entre las muestras se normalizó por tubulina. Se representan autorradiografías representativas de cada hibridación. Los resultados muestran la media \pm S.E.M. de 3 experimentos de sincronización. (C) Se aisló

RNA total de células C9-p β gfp3' β sincronizadas a distintos tiempos tras eliminar el agente bloqueante y se analizó mediante *Northern-blot*. Las membranas se hibridaron secuencialmente con las sondas de cDNA de los genes *gfp*, y 12S. Se representan autorradiografías representativas de cada hibridación. Los resultados muestran la media \pm S.E.M. de 2 experimentos.

Con el fin de confirmar de forma inequívoca que el responsable de la expresión de *gfp* en fase G₂/M del ciclo es el elemento 3'UTR de β -mRNA decidimos generar una nueva línea celular estable. Este nuevo clon, C9-p β gfp3'Tfam, también expresa *gfp* en sus mitocondrias (Figura 4.28 A), pero desde un mRNA quimera de *gfp* en el cual la única variación es la región 3'UTR del mRNA que ha sido sustituida por la región 3'UTR del mRNA del factor de transcripción mitocondrial (Tfam). Previamente, habíamos descrito que esta región no tiene actividad intensificadora de la traducción cuando se compara con la actividad de otros 3'UTRs de la fosforilación oxidativa (Di Liegro y cols., 2000). El análisis de la expresión de *gfp* reveló que en las células C9-p β gfp3'Tfam expresan mucho menos *gfp* que las células C9-p β gfp3' β (Figura 4.28 B). Este resultado es congruente con la diferente actividad intensificadora de la traducción de ambos 3'UTR (Di Liegro y cols.,

2000), aunque otras alternativas como son, el número de copias del plásmido que se han integrado en el genoma, así como el sitio de integración de éste, pudieran contribuir a esta expresión tan diferenciada de gfp entre ambas líneas celulares.

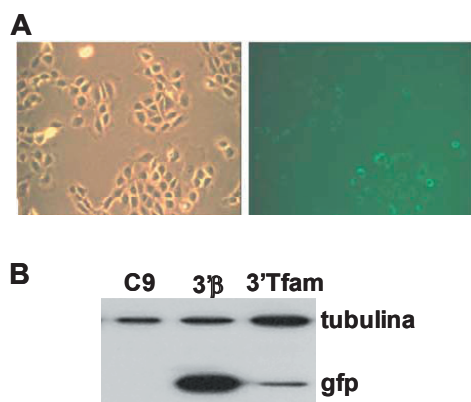


Figura 4.28. **Generación de una línea celular estable con la región 3'UTR del mRNA del factor de transcripción mitocondrial Tfam.** (A) Análisis mediante microscopía de fluorescencia de la expresión de la proteína gfp en células de la línea estable C9-pβgfp3'Tfam. (B) Estudio comparativo de los niveles de expresión de gfp mediante *Western-blot* de las líneas celulares estables C9-pβgfp3'β y C9-pβgfp3'Tfam. Las membranas se hibridaron con el anticuerpo de la proteína gfp. La carga diferencial entre las muestras se normalizó por tubulina.

El estudio de la intensidad de fluorescencia media por célula en células C9-pβgfp3'β en cada una de las fases del ciclo celular reveló que en fase G₂/M estas células tienen el doble de contenido de gfp que en G₀/G₁ (Figura 4.29). Además, la fluorescencia relativa de gfp en este clon en fase G₂/M es significativamente mayor que la de células en fase S (Figura 4.29), resultando la síntesis de gfp en esta fase más del 50% de la síntesis global. Este resultado está de acuerdo con los datos de la cuantificación de la proteína β-F₁-ATPasa en células C9 (Figura 4.24). Contrariamente, el mismo análisis en células C9-pβgfp3'Tfam muestra que la expresión de gfp no se duplica durante el ciclo (Figura 4.29), de hecho, la fluorescencia de gfp no se ve incrementada de forma significativa entre la fase S y G₂/M (Figura 4.29) indicando la relevancia que la secuencia 3'UTR tiene para la expresión del fenotipo de gfp materno. En su conjunto, estos resultados ilustran la importancia del control traduccional durante el ciclo celular para una biogénesis mitocondrial apropiada e indican que la región 3'UTR del mRNA de β-F₁-ATPasa es el elemento responsable de la síntesis de β-F₁-ATPasa en fase G₂/M del ciclo celular.

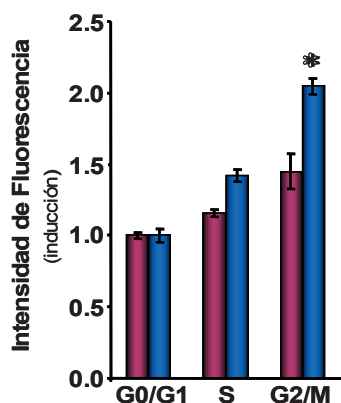


Figura 4.29. **La región 3'UTR del mRNA de β-F₁-ATPasa controla la expresión diferencial de gfp en el ciclo celular.** Análisis de la expresión de gfp en las líneas celulares C9-pβgfp3'β (■) y C9-pβgfp3'Tfam (■) en las distintas fases del ciclo celular mediante citometría de flujo. Los resultados muestran media ± S.E.M de 3 experimentos. *, P<0,05 al comparar frente a fase S con el test de *t* de Student.

4.4.3. Morfología y dinámica mitocondrial durante la mitosis.

Las mitocondrias son orgánulos que cambian su morfología (Karbowski y Youle, 2003) y su distribución (Rojo y cols., 1998) formando una red muy dinámica. La morfología de la mitocondria está controlada por eventos de fusión y fisión de la masa mitocondrial en un equilibrio dinámico que determina la propia distribución intracelular de la mitocondria así como la herencia del mtDNA (Margineantu y cols., 2002). Sin embargo, se conoce muy poco acerca de la morfología mitocondrial a lo largo del ciclo celular (Dewey y Fuhr, 1976; Margineantu y cols., 2002).

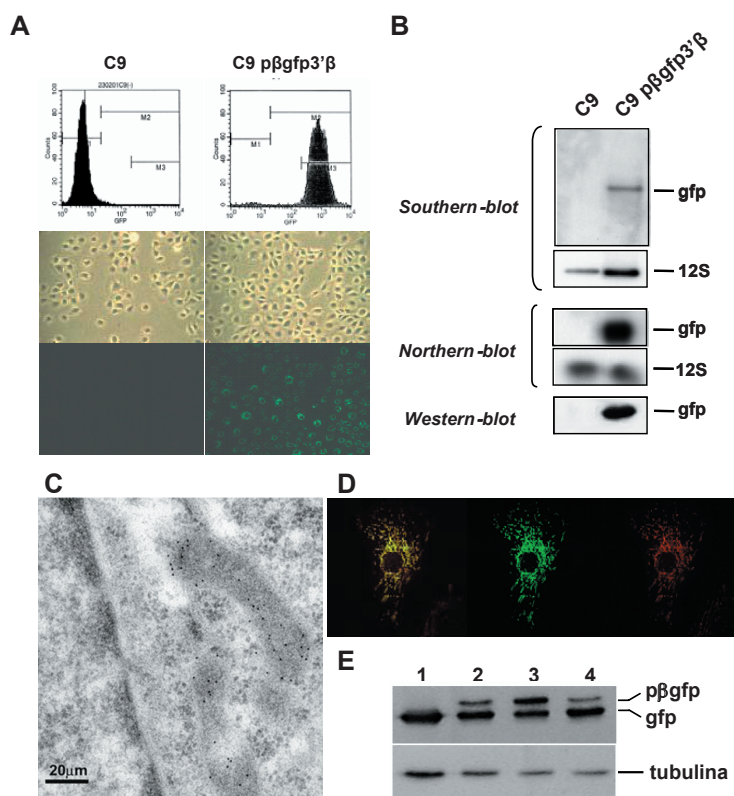


Figura 4.30. La presecuencia de β -F₁-ATPasa dirige gfp a las mitocondrias. (A) Análisis mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia de la expresión de la proteína gfp en células de la línea estable C9-p β gfp3'β. (B) Estudio del genotipo y fenotipo de dicha línea celular mediante *Southern-blot*, *Northern-blot* y *Western-blot*. (C) Análisis de la expresión de gfp en las mitocondrias en células BHK mediante inmunomicroscopía electrónica. (D) Análisis de la expresión de gfp en células C9-p β gfp3'β mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico anti- β -F₁-ATPasa (rojo) estudiando la colocalización (amarillo) con gfp (verde). (E) *Western-blot* de células C9 (1) y BHK (2-4) transfectadas con el plásmido p β GFP3'β. Las membranas se hibridaron con el anticuerpo de la proteína gfp. La carga diferencial entre las muestras se normalizó por tubulina. Se indica la migración de la químera p β -gfp. En el carril 3 las células BHK se trataron con FCCP (4 μ M) más oligomicina (2 μ M) durante 1 hora produciéndose una acumulación de p β -gfp. En el carril 4 las células BHK se lavaron durante 40 minutos después del tratamiento con FCCP y oligomicina produciéndose el procesamiento de p β -gfp a gfp madura.

Con el fin de poder estudiar la dinámica y la morfología de la mitocondria se generaron líneas celulares estables que expresan gfp en sus mitocondrias al fusionar la presecuencia de β -F₁-ATPasa a gfp. Sobre este plásmido básico se clonaron distintas regiones 3'UTR del mRNA que codifican proteínas de la mitocondria. Para ello, células C9 se transfectaron con

el plásmido p β -GFP- β -3'UTR y posteriormente aprovechando la fluorescencia intrínseca de las células positivas, se obtuvieron clones de C9 que expresaran gfp en sus mitocondrias. El análisis de uno de estos clones (C9-p β gfp3' β) por citometría de flujo se muestra en la figura 4.30 A donde se puede apreciar un pico de fluorescencia homogéneo desplazado con respecto al control de células C9 sin transfectar. Con el fin de estudiar el genotipo y fenotipo de esta línea celular se realizaron *Southern*-, *Northern*- y *Western-blot* (Figura 4.30 B). Los resultados indican la integración del plásmido en el genoma de las células, la expresión del mRNA quimera y la expresión estable de la proteína gfp (Figura 4.30 B). Como se puede observar por inmunomicroscopía confocal en células C9-p β gfp-3' β , la introducción de la presecuencia de la proteína β -F₁-ATPasa permite la expresión de gfp en las mitocondrias (Figura 4.30 D). En otro tipo celular, como BHK, la presecuencia de β -F₁-ATPasa también dirige gfp a la mitocondria, como se aprecia por inmunomicroscopía electrónica (Figura 4.30 C), y además permiten identificar la proteína quimera p β -gfp en extractos celulares (Figura 4.30 E), una situación que no se apreció con el clon C9-p β gfp3' β , lo que nos sugiere una mayor eficiencia de la importación de la proteína quimera a la mitocondria en células C9 que en células BHK.

El análisis por microscopía confocal de células C9-p β gfp3' β sincronizadas a 4 horas tras eliminar el agente bloqueante nos permitió observar un alto porcentaje de células en mitosis (Figura 4.31), en consonancia con la estimación previa del momento de la mitosis en esta línea celular tras la eliminación del bloqueo (Figura 4.22 C). Al igual que otros autores (Collins y Bootman, 2003), observamos que la morfología de las mitocondrias en células en interfase es filamentosa, dando lugar a una red tubular de mitocondrias que se encuentra interconectada con el citoesqueleto de tubulina (Figura 4.31 a-e) y de actina (Figura 4.31 f-h). Las mitocondrias en interfase se encuentran preferencialmente agrupadas en torno al núcleo, aunque también se pueden observar mitocondrias localizadas en la periferia (Figura 4.31 a). Cuando la célula entra en división esta red tubular mitocondrial se desorganiza y se puede observar como se fisianan originando organelas puntiformes (especialmente en metafase) (Figuras 4.31 c y g; ver video 2 y 4.32). Durante etapas tempranas de la mitosis las mitocondrias quedan excluidas del espacio celular donde se está generando el huso mitótico (profase), así como del ecuador de la célula donde se alinean los cromosomas (metafase) (Figuras 4.31 y 4.32). En anafase, la morfología de la mitocondria es mayoritariamente puntiforme y se localiza en la periferia de la célula (Figuras 4.31 y 4.32). En anafase tardía y telofase la mitocondria va ocupando el ecuador de la célula a medida que los cromosomas se han separado hacia los polos (Figura 4.31 y 4.32 y video 2). En telofase tardía, justo antes de la citocinesis, la mitocondria cambia su morfología de nuevo a una forma más filamentosa (Figuras 4.31 y 4.32). En general, la distribución de las mitocondria durante mitosis no parece estar asociada al citoesqueleto de tubulina (Figura 4.31 a-e) ni al de actina (Figura 4.31 f-h). Asimismo, la distribución de las mitocondrias no parece seguir un patrón establecido a la hora de distribuirse en las células hijas, esto es, aparenta ser

RESULTADOS

un proceso aleatorio. Por otro lado, se debe destacar el enriquecimiento de β -actina en el cortex celular (Figur 4.31 g-h) durante la mitosis, proceso que controlará la formación de filopodios (protusiones rojas en la Figura 5g) que son responsables de promover los cambios en la morfología celular durante la mitosis (ver Figura 32 y video 2).

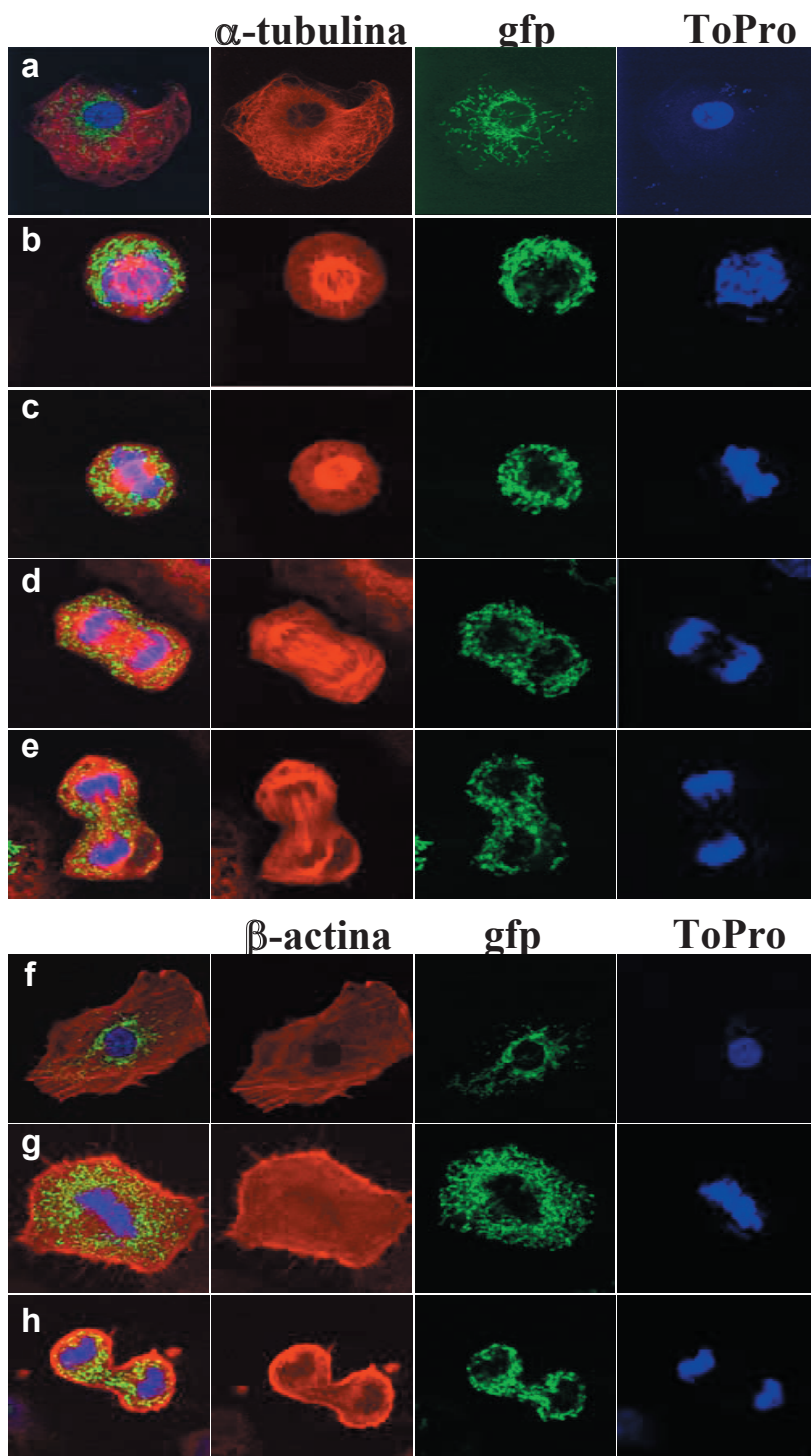


Figura 4.31. **Morfología y dinámica de la mitocondria durante el ciclo celular.** Inmunofluorescencias de células C9-p β gfp3' β sincronizadas 4 horas después de eliminar el agente bloqueante. En verde, gfp; en rojo, las proteínas de citoesqueleto α -tubulina (a-e) y β -actina (f-h); y en azul, núcleos teñidos con la sonda de ácidos nucleicos To-Pro. En la figura se observan los cambios morfológicos mitocondriales en los distintos periodos de la mitosis.

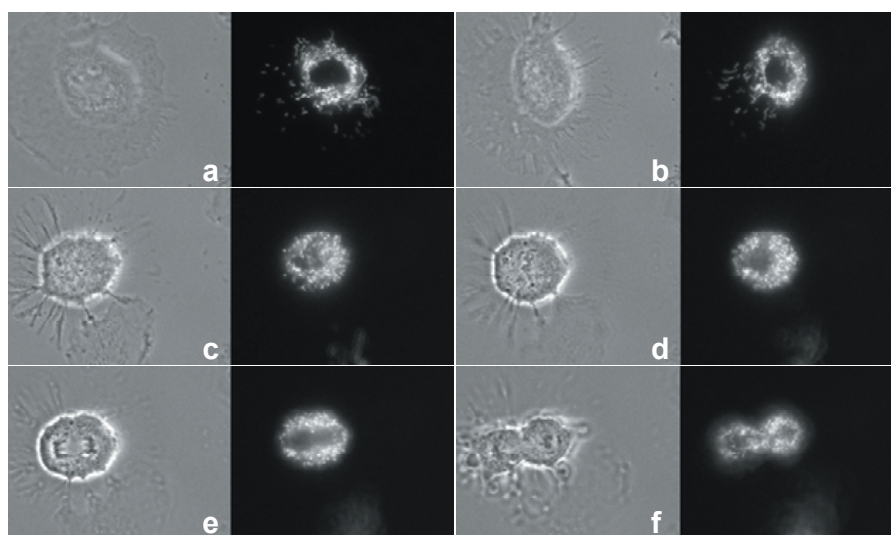


Figura 4.32. **Dinámica mitocondrial durante el ciclo celular.** Células C9-pβgfp3'β se visualizaron y grabaron por microscopía de fluorescencia. Diferentes fotogramas de la película (ver material suplementario video 2) ilustran los cambios morfológicos y el dinamismo que sufren las mitocondrias al comenzar la célula la división.

4.5. LA SUBUNIDAD CATALÍTICA β -F₁-ATPasa DE LA H⁺-ATP SINTASA NO TIENE UNA EXPRESIÓN ECTÓPICA.

El complejo F₁F₀-ATPasa de las mitocondrias, eubacterias y cloroplastos cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi usando el gradiente electroquímico de protones generado por las cadenas respiratoria o fotosintética (Boyer, 1997). Recientemente, varios autores han propuesto que existe una expresión ectópica de este complejo en distintos tipos celulares con diferente función. Estudios previos habían demostrado la presencia de la subunidad catalítica β -F₁-ATPasa de la mitocondria en la superficie de varias líneas celulares tumorales cuya función sería transportar H⁺ a través de la membrana plasmática originando citólisis (Das y cols., 1994). Más recientemente, Pizzo y cols. han postulado una expresión de F₁F₀-ATP sintasa en membrana plasmática de células endoteliales con función de receptor de angiostatina, estando así implicada en la proliferación celular (Moser y cols., 1999; Burwick y cols., 2005) y en la apoptosis dependiente de caspasas (Veitonmaki y cols., 2004) de este tipo celular. De igual modo, el grupo de Barbaras ha propuesto que la subunidad catalítica de la H⁺-ATP sintasa (β -F₁-ATPasa) es un receptor de alta afinidad para la apolipoproteína A-I que se encuentra localizado en la membrana plasmática de hepatocitos porcinos, de rata y humanos, así como en células HepG2 (Martinez y cols., 2003). Por la relevancia que la H⁺-ATP sintasa tiene en la transducción de la energía metabólica (Boyer, 1997), y en la ejecución de la apoptosis (Santamaria y cols., 2006), así como por la implicación de esta proteína en progresión tumoral (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols. 2004; Isidoro y cols., 2005), hemos creído conveniente verificar estos resultados en nuestro laboratorio.

4.5.1. Expresión no ectópica de β -F₁-ATPasa en hígado de mamíferos.

La inmunohistoquímica de cortes de hígado humano embebidos en parafina usando un anticuerpo policlonal (Ab2) generado contra la proteína recombinante β -F₁-ATPasa de hígado de rata (Cuezva y cols., 2002) no revela la presencia de material inmunorreactivo en la membrana plasmática de hepatocitos humanos mientras que sí muestra un fuerte marcaje en organelas citoplasmáticas (Figura 4.33 A). De igual manera, la inmunomicroscopía electrónica de muestras de hígado de rata embebidas en Lowicryl usando un anticuerpo policlonal (Ab3) generado contra la subunidad β -F₁-ATPasa purificada de hígado de rata (Egea y cols., 1997) (Figura 4.33 B) así como criocortes de muestras de células HepG2 usando el anticuerpo policlonal Ab2 (Figura 4.33 C) no revelan la presencia de partículas de oro en la membrana plasmática y sí un marcaje muy significativo en las mitocondrias. En su conjunto, el uso de dos anticuerpos policlonales distintos mediante tres técnicas diferentes de inmunolocalización no revela la presencia de β -F₁-ATPasa en la membrana plasmática de hígado humano, ni de rata ni de células HepG2.

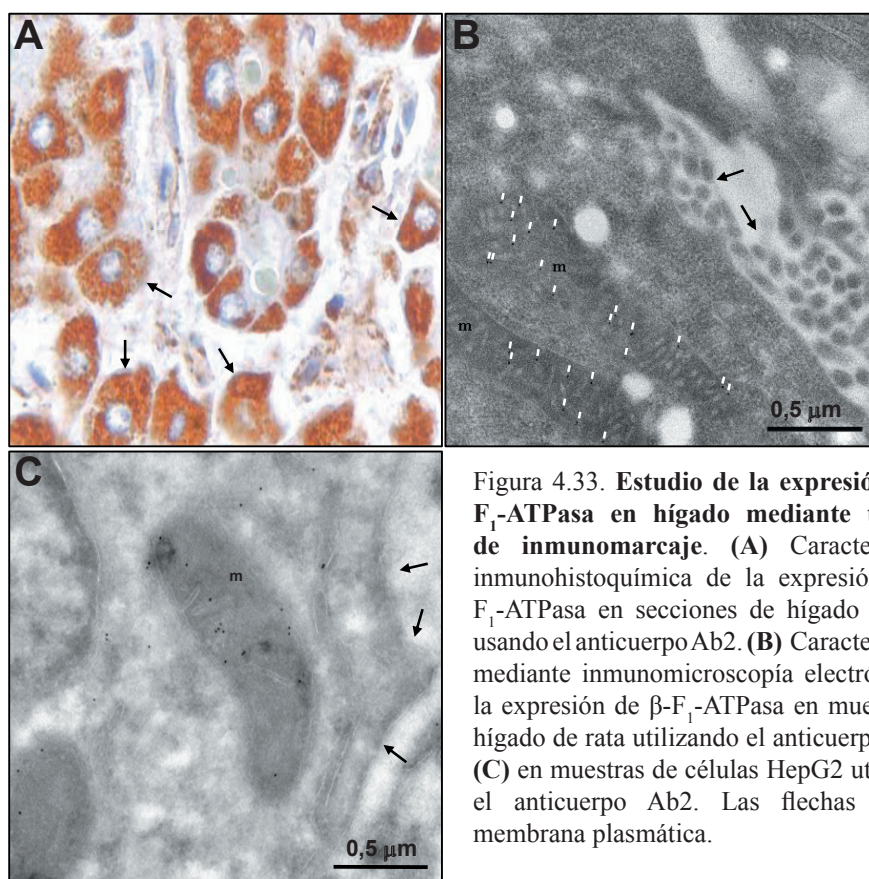


Figura 4.33. Estudio de la expresión de β -F₁-ATPasa en hígado mediante técnicas de inmunomarcaje. (A) Caracterización inmunohistoquímica de la expresión de β -F₁-ATPasa en secciones de hígado humano usando el anticuerpo Ab2. (B) Caracterización mediante inmunomicroscopía electrónica de la expresión de β -F₁-ATPasa en muestras de hígado de rata utilizando el anticuerpo Ab3 y (C) en muestras de células HepG2 utilizando el anticuerpo Ab2. Las flechas señalan membrana plasmática.

La inmunofluorescencia en células HepG2 realizada con anticuerpos monoclonales comerciales generados contra las proteínas β -F₁-ATPasa (Ab1) y α -F₁-ATPasa no revela la presencia de señal inmunorreactiva en la membrana plasmática de células no permeabilizadas (Figura 4.34 A i-ii), contrariamente a lo mostrado por Barbaras (Martinez y cols., 2003). Únicamente, se aprecia alguna señal verde localizada en el citoplasma, y

no en la membrana plasmática, en algunas células HepG2 (Figura 4.34 i-ii). Este hecho se debe probablemente a una permeabilización parcial ocurrida durante el proceso de fijación. Los mismos anticuerpos usados en células permeabilizadas documentan claramente que la señal inmunorreactiva está confinada a estructuras citoplasmáticas compatibles con la mitocondria (Figura 4.34 A, iv-v). Resultados similares fueron obtenidos cuando realizamos la inmunofluorescencia con el anticuerpo policlonal Ab2 (Figura 4.34, A iii, vi). En este caso, además, se documenta la señal inmunorreactiva en membrana plasmática de β -catenina en las células HepG2 no permeabilizadas que pone de manifiesto con mayor claridad la ausencia de co-localización de estas proteínas (Figura 4.34 A, iii).

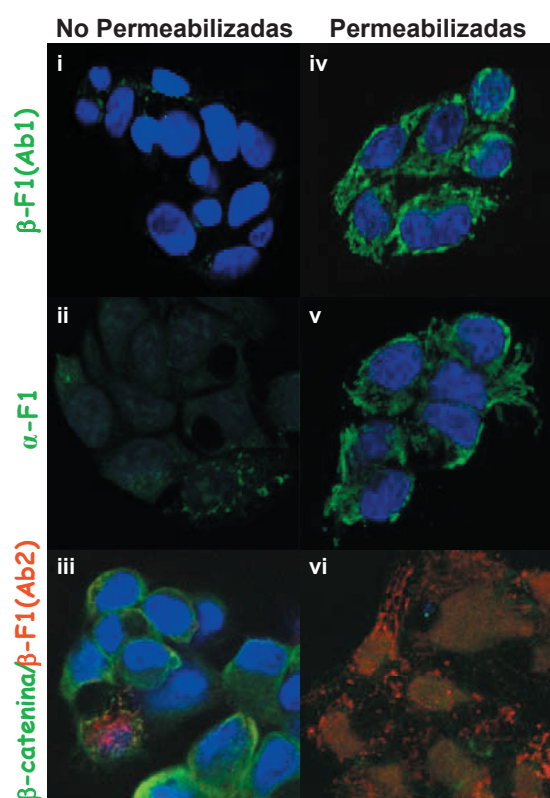


Figura 4.34. Estudio de la expresión de β -F₁-ATPasa en células HepG2 mediante inmunofluorescencia. Se analizó la expresión de β -F₁-ATPasa y α -F₁-ATPasa en células HepG2 crecidas en cubres mediante inmunofluorescencia, tanto en células no permeabilizadas (i-iii), para estudiar la expresión de la proteína en membrana plasmática, como en células permeabilizadas (iv-vi), para observar tinción intracitoplasmática utilizando los anticuerpo Ab1 (anticuerpo monoclonal comercial) y Ab2 (anticuerpo policlonal generado en el laboratorio). Como control de tinción en membrana plasmática se usó un anticuerpo contra β -catenina. El DNA nuclear se tiñó con la sonda ToPro.

Analizamos la expresión de β -F₁-ATPasa en células permeabilizadas y no permeabilizadas mediante citometría de flujo usando el anticuerpo monoclonal Ab1, usado para esta técnica por Barbaras, (Figura 4.35 A). En el caso de las células permeabilizadas, se observa un claro desplazamiento del pico de intensidad de fluorescencia (línea punteada) cuando la comparamos con respecto a la fluorescencia del control, que corresponde a la señal obtenida sólo con el anticuerpo secundario marcado (línea continua). Esta señal corresponde a la detección intracitoplasmática de β -F₁-ATPasa de las células permeabilizadas (Figura 4.35 A). Sorprendentemente, cuando realizamos la misma aproximación en células no permeabilizadas vemos un desplazamiento del pico de fluorescencia (línea punteada) con respecto al pico control (línea continua) (Figura 4.35 A). Este resultado podría indicar la existencia de material inmunorreactivo en membrana plasmática, como dice Barbaras (aproximadamente un 20% de la señal anterior), o bien que durante el proceso de fijación

RESULTADOS

de las células se ha permeabilizado un porcentaje de las mismas. En este sentido, se realizó un marcaje de las células con yoduro de propidio que indica (i) que el proceso de fijación empleado por Barbaras produce una alta permeabilización (>80%) de las células (Figura 4.35 B) y (ii) que una menor fijación (la usada por nosotros) no puede impedir la permeabilización parcial de las células (aproximadamente un 10-15%) (Figura 4.35 C). Es decir, la señal debida a Ab1 en células no permeabilizadas es imputable a la detección de material intracitoplasmático.

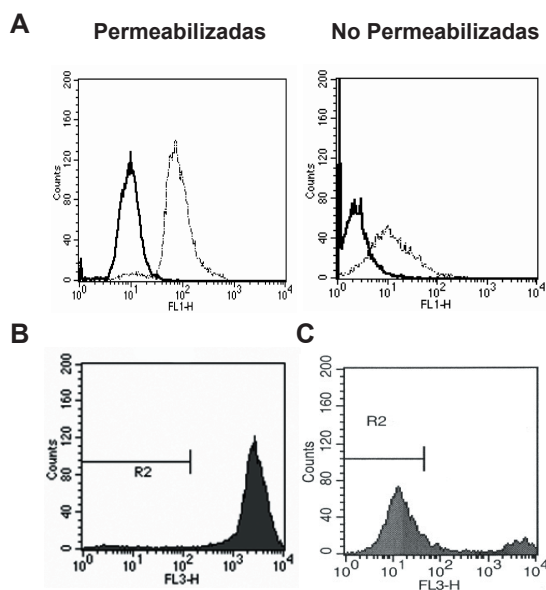


Figura 4.35. Estudio de la expresión de β -F₁-ATPasa en células HepG2 mediante citometría de flujo. (A) Análisis de la expresión de β -F₁-ATPasa tanto en células HepG2 permeabilizadas, para observar tinción intracitoplasmática, como en células no permeabilizadas, para estudiar la expresión de la proteína en membrana plasmática, mediante citometría de flujo utilizando el anticuerpo Ab1. Las líneas continuas representan la señal de fluorescencia del control en el que las células se incuban únicamente con el anticuerpo secundario. Las líneas discontinuas representan la señal de fluorescencia de la expresión del marcador al incubarse con el anticuerpo primario. (B) Tinción de células HepG2 con yoduro de propidio (IP) tras una fijación de las células con 3% ó (C) 1% de paraformaldehído en PBS durante 30 minutos. La región R2 corresponde a tinción negativa para yoduro de propidio. Una mayor fijación con paraformaldehído provoca una mayor permeabilización de las células HepG2.

Para confirmar la ausencia de expresión de β -F₁-ATPasa en la membrana plasmática de hepatocitos se prepararon homogenizados de hígado de rata y, mediante técnicas de fraccionamiento subcelular, obtuvimos fracciones puras de mitocondria y de membrana plasmática. Se realizó el estudio de la expresión de β -F₁-ATPasa mediante *Western-blot* con los tres anticuerpos utilizados previamente y con otro anticuerpo desarrollado recientemente en el laboratorio (Ab4, anticuerpo monoclonal generado contra la proteína humana recombinante), así como con anticuerpos contra marcadores de mitocondria (Hsp60) y de membrana plasmática (E-cadherina). El uso de estos marcadores, Hsp60 y E-cadherina, nos confirmó el enriquecimiento y grado de pureza de las fracciones de mitocondria y membrana plasmática respectivamente cuando se compara con respecto al homogenado, ya que no se encuentra marca de señal de proteína mitocondrial en membrana plasmática ni de membrana plasmática en la fracción mitocondrial (Figura 4.36). Ninguno de los cuatro anticuerpos usados contra β -F₁-ATPasa reconoce una banda en las proteínas de la fracción de membrana plasmática de hepatocitos (Figura 4.36). Estos resultados confirman los obtenidos por otras técnicas de inmunocitoquímica y por tanto, indican que no existe una expresión ectópica de esta proteína en la membrana plasmática de hepatocitos.

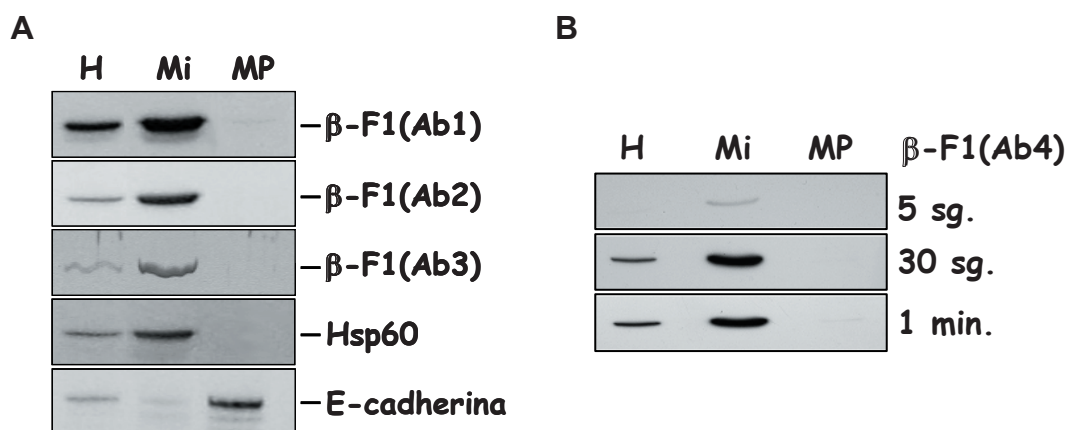


Figura 4.36. Análisis de la expresión de β -F₁-ATPasa en distintos compartimentos celulares obtenidos mediante fraccionamiento subcelular de hígado de rata. (A) Western-blot del homogenado (H), de la fracción mitocondrial (Mi) y de membrana plasmática (MP) obtenidas. Los anticuerpos utilizados en este análisis fueron los anticuerpos contra β -F₁-ATPasa Ab1 (anticuerpo monoclonal comercial), Ab2 (anticuerpo policlonal generado contra la proteína recombinante de hígado de rata), Ab3 (anticuerpo policlonal generado contra la cadena β -F₁-ATPasa purificada de hígado de rata) y Ab4 (anticuerpo monoclonal generado contra la proteína humana recombinante). Se usaron Hsp60 y E-cadherina como marcadores de pureza de las fracciones de mitocondria y membrana plasmática respectivamente. (B) Se realizaron exposiciones de la membrana a distintos tiempos con el anticuerpo Ab4 para saturar la señal de mitocondria.

Finalmente, células C9 establemente transfectadas con el plásmido p β -GFP- β -3'UTR que expresa la proteína verde fluorescente (gfp) fusionada con la presecuencia de β -F₁-ATPasa (ver apartado 4.4.3) indican que la presecuencia de β -F₁-ATPasa dirige gfp única y exclusivamente a la mitocondria (Figura 4.37).

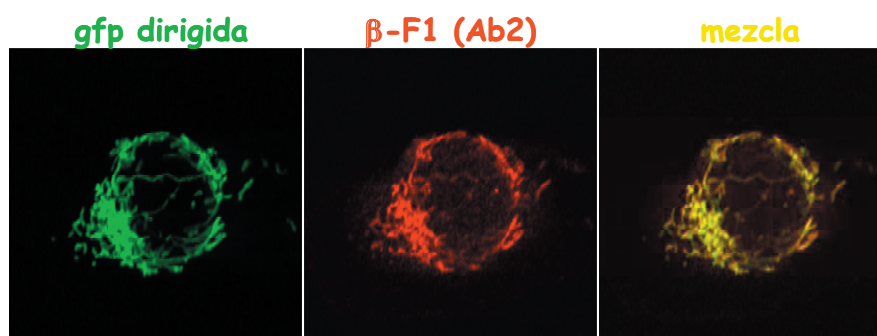


Figura 4.37. La presecuencia de β -F₁-ATPasa dirige la proteína exclusivamente a la mitocondria. Inmunofluorescencias de gfp dirigida a la mitocondria (verde) y la subunidad β -catalítica de la H⁺-ATP sintasa usando el anticuerpo Ab2 (anticuerpo policlonal generado contra la proteína recombinante β -F₁-ATPasa de rata) (rojo) en células C9 de hígado de rata presentan una colocalización total (amarillo) de la tinción mitocondrial sin observarse señal alguna en la membrana plasmática.

4.5.2. Expresión no ectópica de β -F₁-ATPasa en endotelio y en células tumorales.

Decidimos ampliar el estudio a células endoteliales debido a que es en este tejido donde más ampliamente se ha descrito la presencia de la proteína β -F₁-ATPasa en membrana plasmática como receptor de angiostatina (Moser y cols., 1999; Burwick y cols., 2005). El patrón de estudio llevado a cabo fue similar al utilizado en hígado y se realizó en células endoteliales HMEC-1 (*Human Microvascular Endothelial Cell line*).

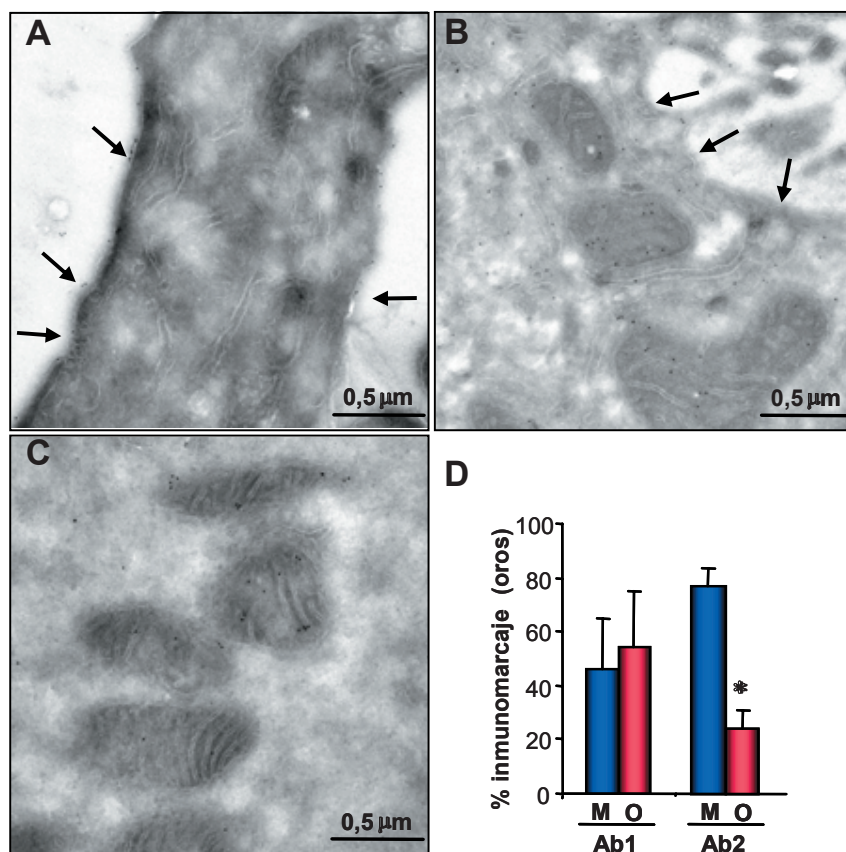


Figura 4.38. Estudio de la expresión de β -F₁-ATPasa en células endoteliales mediante microscopía electrónica. (A) Caracterización mediante inmunomicroscopía electrónica de la expresión de β -F₁-ATPasa en criosecciones de muestras de células HMEC-1 utilizando el anticuerpo Ab1 (anticuerpo monoclonal comercial) y (B) el anticuerpo Ab2 (anticuerpo policlonal generado contra la proteína recombinante de hígado de rata). (C) Caracterización inmunohistoquímica de la expresión de la glicoproteína endoglina, una proteína de membrana plasmática, en criosecciones de células HMEC-1. (D) Cuantificación de la expresión de β -F₁-ATPasa en los distintos compartimentos celulares. El histograma muestra el porcentaje de inmunomarcaje en mitocondria (M, ■) y el porcentaje de inmunomarcaje extramitocondrial (O, ■). Los resultados muestran la media \pm S.E.M. del conteo en 20 inmunomicroscopías. *, $P < 0,05$ al comparar frente a inmunomarcaje mitocondrial con el test de t de Student. Las flechas señalan membrana plasmática.

En inmunomicroscopías electrónicas de células HMEC-1 usamos como control de marcaje en membrana plasmática un anticuerpo contra endoglina, una glicoproteína transmembrana expresada predominantemente en endotelio. Como puede observarse (Figura 4.38 A), el oro decora con nitidez la membrana plasmática de HMEC-1, lo que indica que esta técnica nos permite observar la expresión de proteínas en la membrana plasmática. El uso del anticuerpo Ab1 no muestra señal inmunorreactiva en membrana plasmática, a pesar de observarse un mayor fondo del inmunomarcaje (Figura 4.38 B-D). De forma similar, pero con mayor significatividad de marcaje, el anticuerpo Ab2 tampoco muestra señal inmunorreactiva en la membrana plasmática de células HMEC-1 (Figura 4.38 C-D). Es muy importante resaltar que el anticuerpo Ab1 presenta una inmunorreactividad similar tanto en mitocondria como en localización extramitocondrial (Figura 4.38 D), lo que sugiere la menor especificidad de este anticuerpo para técnicas de inmunomicroscopía

electrónica. Estos resultados no apoyan la presencia de β -F₁-ATPasa en la membrana plasmática de células endoteliales humanas.

Asimismo, la inmunofluorescencia en células HMEC-1 realizada con los anticuerpos Ab1 y Ab2 no revela la presencia de señal inmunorreactiva en la membrana plasmática en las células no permeabilizadas (Figura 4.39 A, i-ii). En estas condiciones, únicamente se aprecia alguna señal intracelular en unas pocas células HMEC-1 (Figura 4.39 A, i-ii). Los mismos anticuerpos usados en células permeabilizadas documentan claramente que la señal inmunorreactiva está confinada en estructuras citoplasmáticas compatibles con la mitocondria (Figura 4.39 A, iii-iv). Como en el caso de células HepG2 (Figura 4.35) se observa que la membrana plasmática de células HMEC-1 no permeabilizadas, decorada por un anticuerpo contra la proteína β -catenina, no presenta señal de colocalización con β -F₁-ATPasa (Figura 4.39 A, ii).

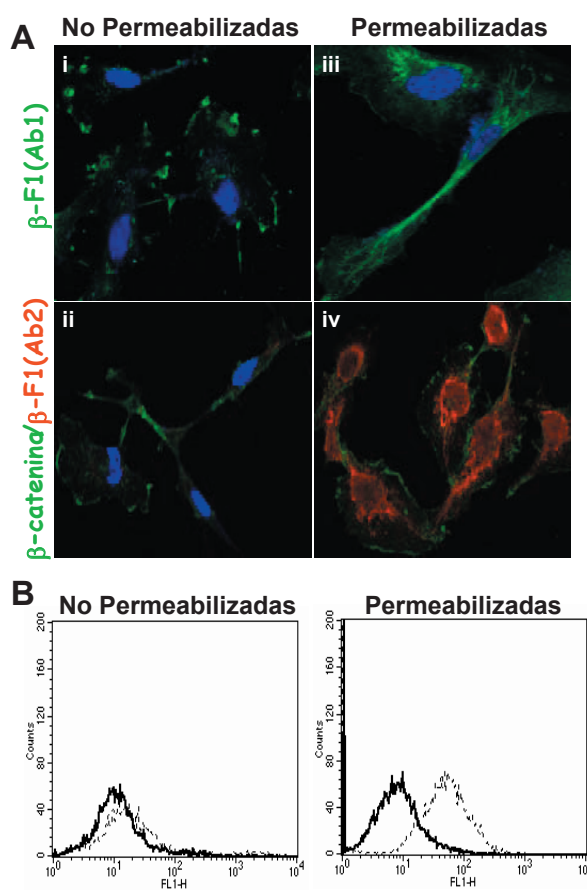


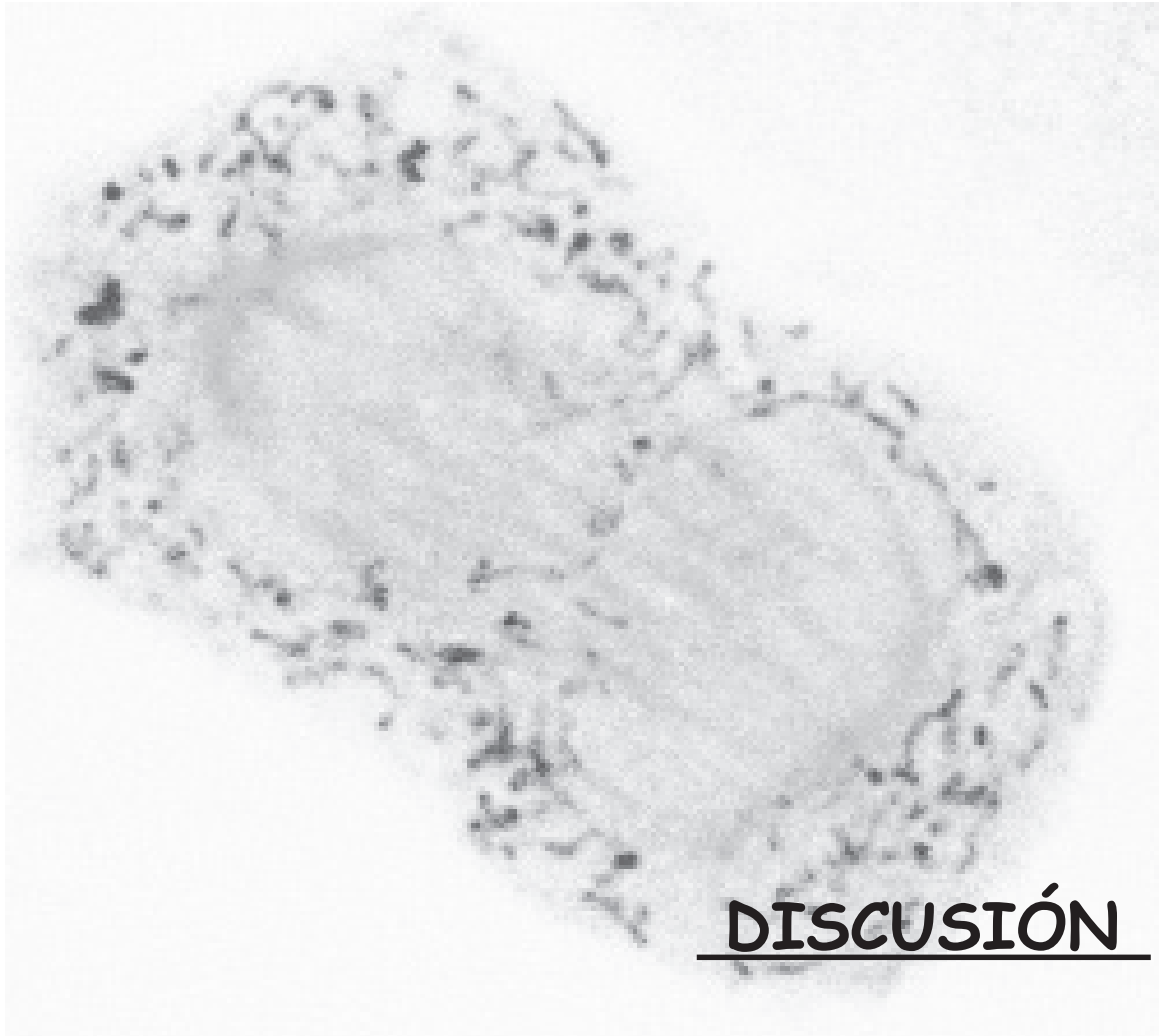
Figura 4.39. Expresión de β -F₁-ATPasa en células HMEC-1. (A) Se analizó la expresión de β -F₁-ATPasa en células HMEC-1 crecidas en cubres mediante inmunofluorescencia, tanto en células no permeabilizadas (i-ii), para estudiar la expresión de la proteína en membrana plasmática, como en células permeabilizadas (iii-iv), para observar tinción intracitoplasmática, utilizando los anticuerpos Ab1 (anticuerpo monoclonal comercial) y Ab2 (anticuerpo policlonal generado contra la proteína recombinante de hígado de rata). Como control de tinción en membrana plasmática se usó un anticuerpo contra β -catenina. El DNA nuclear se tiñó con la sonda ToPro. (B) Análisis de la expresión de β -F₁-ATPasa en células HMEC-1 permeabilizadas, para observar tinción intracitoplasmática, como en células no permeabilizadas, para estudiar la expresión de la proteína en membrana plasmática, mediante citometría de flujo utilizando el anticuerpo Ab1. Las líneas continuas representan la señal de fluorescencia control incubando las células únicamente con el anticuerpo secundario. Las líneas discontinuas representan la señal de fluorescencia de la expresión del marcador al incubarse con el anticuerpo primario.

El estudio de la expresión de β -F₁-ATPasa con el anticuerpo Ab1 en células HMEC-1 mediante citometría de flujo (Figura 4.39 B) apoya los resultados obtenidos previamente (Figuras 4.38 y 4.39 A) en el sentido de que β -F₁-ATPasa no se expresa en la membrana plasmática. En el caso de las células permeabilizadas se puede observar un claro desplazamiento del pico de intensidad de fluorescencia (línea punteada) cuando la comparamos con respecto al pico de fluorescencia control (línea continua) (Figura 4.39 B).

RESULTADOS

Cuando realizamos la misma tinción en células no permeabilizadas, no se aprecia ningún desplazamiento del pico de fluorescencia (línea punteada) con respecto al pico control (línea continua) (Figura 4.39 B). Estos resultados indican que no existe una expresión ectópica de β -F₁-ATPasa en células del endotelio.

Se realizaron estudios similares en células de carcinoma humano de pulmón (A549) obteniéndose los mismos resultados (datos no mostrados). En su conjunto, nuestros resultados contradicen los datos de otros autores indicando que no se produce la expresión ectópica de la proteína β -F₁-ATPasa en membrana plasmática.



5.1. Fenotipo metabólico del cáncer.

El uso de técnicas genómicas (Petricoin y cols., 2002; Ramaswamy y Golub, 2002) y proteómicas (Wulfkühle y cols., 2003) a gran escala está permitiendo el análisis de los patrones de expresión de los genes y proteínas que se encuentran asociados con el fenotipo de un determinado tipo de tumor, proporcionando lo que se ha denominado la “huella” o “firma” de un tipo determinado de cáncer (Liotta y Kohn, 2003; Ramaswamy y cols., 2003). El inconveniente de la determinación mediante estos métodos del fenotipo del cáncer es la dificultad para implementarlos en clínica oncológica. Hasta hace muy poco, el metabolismo energético de los tumores no despertaba interés en oncología a pesar de que una de las primeras características descritas en este campo fue la alta glucólisis aeróbica de la célula tumoral (Warburg, 1956a). Otto Warburg propuso que la glucólisis aeróbica observada en la gran mayoría de los tumores sólidos era debida a una deficiencia en la función bioenergética de la mitocondria de las células tumorales (Warburg, 1956a). Esta hipótesis ha sido muy controvertida, habiendo sido rechazada (Weinhouse, 1956; Krebs, 1981) o bien considerada un epifenómeno de la transformación celular (Garber, 2004; Garber, 2006). En la actualidad, numerosas evidencias clínicas, moleculares, funcionales e incluso biotecnológicas indican que esta interpretación no es sostenible (Pedersen y cols., 2002; Cuezva y cols., 2002; Danial y cols., 2003; Xu y cols., 2005). Los resultados que se recogen en esta tesis abundan en este sentido.

Trabajos previos de nuestro laboratorio (Cuezva y cols., 2002; Isidoro y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005) han puesto de manifiesto un gran cambio en el proteoma del metabolismo energético de los tumores humanos de hígado, mama, pulmón, colon, riñón y estómago. Estos resultados han sido confirmados y extendidos a otros tumores por otros grupos (Unwin y cols., 2003; He y cols., 2004; Yin y cols., 2004; Meierhofer y cols., 2004; Hervouet y cols., 2005). De hecho, la gran mayoría de las muestras de tumores analizadas, dentro de cada tipo de neoplasia, mostró una alteración del potencial mitocondrial global de la célula (índice BEC). A esta disminución del índice BEC de los tumores se la ha denominado la “huella bioenergética” del cáncer (Cuezva y cols., 2002). En esta tesis se ilustra que la competencia bioenergética de la mitocondria (razón $\beta F_1/Hsp60$) y el índice BEC están asimismo disminuidas en carcinomas de esófago. Recientemente, hemos demostrado la existencia de una correlación inversa altamente significativa entre el potencial mitocondrial de la célula y la captura de glucosa y flujo glucolítico de los tumores “*in vivo*” e “*in vitro*” (Lopez-Rios y cols., 2007). Es decir, los resultados en carcinomas de esófago sugieren que la carcinogénesis en este tipo celular también afecta a la función bioenergética de la mitocondria. Sin embargo, contrariamente a lo descrito para otros tumores (Cuezva y cols., 2002; Isidoro y cols., 2004), no se aprecia un aumento en la expresión de marcadores glucolíticos en carcinomas de esófago, lo que puede sugerir que la intensificación de la ruta glucolítica se ejerce en este tipo tumoral mediante control alostérico de la vía.

El proteoma glucolítico y mitocondrial de los diferentes tipos celulares de los mamíferos

difiere sustancialmente (Mootha y cols., 2003), tanto en términos de los niveles relativos de expresión de las proteínas así como en la expresión de isoformas específicas de cada tipo celular. Esto se pone de manifiesto en cáncer de piel, en donde el aumento de expresión de HK-III es un marcador de malignidad, ya que está aumentado en melanomas y metástasis cuando se compara con la lesión benigna de los nevus. Igualmente, la pérdida de expresión de la isoforma M de PK está ligada a las metástasis de melanoma. Por contra, la expresión de esta isoforma está muy aumentada en la carcinogénesis de mama (Isidoro y cols., 2005).

Un caso aparte son los carcinomas de próstata donde no se aprecia ningún cambio de expresión en los marcadores del índice BEC que hemos estudiado. En condiciones normales, la próstata tiene un metabolismo glucolítico exacerbado ya que tiene el ciclo de Krebs interrumpido con objeto de sintetizar y secretar citrato para el fluido seminal (Singh y cols., 2006). La inhibición del ciclo de Krebs se consigue porque en las células de próstata se acumulan grandes cantidades de zinc, lo que origina la inhibición de la aconitasa y la consecuente interrupción del ciclo (Singh y cols., 2006). En su conjunto, parece que la carcinogénesis afecta diferencialmente el fenotipo energético de la célula de manera tejido-específico (Cuezva y cols., 2002; Isidoro y cols., 2004).

La existencia de una característica común a la mayoría de los tipos de tumores nos permitió proponer que la alteración fenotípica del metabolismo energético de la célula tumoral aporta una herramienta para el diagnóstico y pronóstico de pacientes con cáncer, es decir, una “huella bioenergética” de utilidad clínica. De hecho, esta “huella bioenergética” correlaciona con la supervivencia de pacientes con cáncer de colon (Cuezva y cols., 2002), pulmón (Cuezva y cols., 2004) y mama (Isidoro y cols., 2005), lo que sugiere la implicación de la mitocondria en la progresión del cáncer. Además, se ha sugerido que la “huella bioenergética” de los tumores proporciona un marcador predictivo de la respuesta del tumor a la quimioterapia (Shin y cols., 2005; Santamaria y cols., 2006) así como para el diseño de estrategias futuras en el tratamiento del cáncer (Pelicano y cols., 2006; Tomiyama y cols., 2006).

En esta tesis se muestran los resultados obtenidos sobre progresión de la enfermedad con una cohorte de pacientes de melanoma. Como en el caso de la gran mayoría de tumores humanos, en la generación del melanoma influyen factores genéticos y medioambientales. El melanoma maligno se desarrolla en tres fases diferentes: fase de crecimiento radial (no invasivo), vertical (invasivo) y enfermedad metastásica. Los eventos moleculares que explican la génesis del melanoma han sido parcialmente caracterizados, habiéndose identificado un número pequeño de genes que juegan un papel clave en la generación y desarrollo del tumor (Arbiser y cols., 2002; Chin, 2003; Govindarajan y cols., 2007). Así, se han descrito un conjunto de marcadores moleculares que, medidos en sangre de los pacientes mediante RT-PCR, son indicadores de la recurrencia de la enfermedad (Hoon y cols., 2000). Sin embargo, el comportamiento clínico de los pacientes con melanoma se explica únicamente por los datos clínicos e histológicos del tumor ya que el uso de técnicas

moleculares analíticas masivas hasta ahora ha influido poco en este campo (Carr y cols., 2003). Sí se ha conseguido conocer la presencia de anomalías en el punto de chequeo G₁/S que constituyen un paso crítico en la generación y la progresión del tumor y que pudieran tener uso en clínica oncológica (Alonso y cols., 2004).

A pesar de los esfuerzos realizados para identificar marcadores de la progresión del melanoma que permitan agrupar a los pacientes en grupos de riesgo específicos, no se han encontrado marcadores moleculares, histopatológicos o inmunohistoquímicos que definan subgrupos en esta neoplasia (Carr y cols., 2003). En este sentido, la “huella bioenergética” celular de los melanomas aporta unos marcadores moleculares capaces de discriminar entre dos grupos de diferente agresividad, donde el marcador más significativo de malignidad es la pérdida de expresión de la isoforma III de la HK. Debemos destacar que la población de pacientes con melanoma que hemos utilizado es una muestra representativa de este tipo de tumores ya que los marcadores clínico-patológicos se ajustan a lo propuesto por otros (Balch y cols., 2001). A pesar de la heterogeneidad de esta enfermedad, la “huella” metabólica permite una discriminación al 100% entre las biopsias de melanoma y las biopsias de metástasis de melanoma. La diferencia más acusada entre estos dos tipos de biopsias es una marcada disminución de la expresión de la isoforma M de PK en las metástasis. Además, y de acuerdo con los resultados de nuestro grupo en otras neoplasias (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005), la razón β -F₁/GAPDH, que es un indicador del potencial mitocondrial de la célula, proporciona un marcador significativo de supervivencia libre de enfermedad en pacientes con melanoma, en donde una disminución de esta razón está asociada con un peor pronóstico clínico. Este resultado sugiere que la alteración progresiva del proteoma mitocondrial con un incremento del potencial glucolítico en melanomas también es una condición metabólica requerida para la progresión del tumor.

Se han propuesto diversas hipótesis para explicar el fenotipo metabólico de los tumores, también llamado efecto Warburg. Muchos autores han establecido una relación entre mutaciones en el DNA que impactan sobre genes del metabolismo energético de la célula, tanto nuclear (Baysal y cols., 2000; Habano y cols., 2003; Neumann y cols., 2004) como mitocondrial (Parrella y cols., 2001; Carew y Huang, 2002; Tan y cols., 2002), y el metabolismo glucolítico de estos tumores. También, se ha sugerido que la estimulación de la glucólisis podría ser la consecuencia del entorno hipóxico donde se desarrolla el tumor (Semenza y cols., 2001; Zu y Guppy, 2004). En este sentido, se ha visto cómo el factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1 α aumenta la expresión de transportadores de glucosa así como de muchas de las enzimas glucolíticas (Semenza, 2003) (Figura 5.1).

Los oncogenes, junto con los genes supresores de tumores, son considerados los responsables directos de los procesos de proliferación y supervivencia celular en cáncer. La activación /disfunción de estos genes lleva asociada cambios metabólicos que hasta hace poco eran considerados efectos secundarios de la alteración génica (Dang y Semenza,

1999; Kim y Dang, 2006). En este sentido, muchos autores han descrito que mutaciones en oncogenes y proteínas relacionadas con los patrones de trasducción de señales (AKT, RAS, MYC, SRC, mTOR) son las responsables del efecto Warburg de los tumores porque promueven por diferentes vías la activación de la glucólisis (Osthus y cols., 2000; Rathmell y cols., 2003; Elstrom y cols., 2004; Kim y Dang, 2006; Bensaad y cols., 2006; Schieke y cols., 2006) (Figura 5.1). Los resultados mostrados en esta tesis confirman que la expresión de Akt activa promueve un aumento en la expresión de GAPDH con la consiguiente estimulación de la glucólisis (Govindarajan y cols., 2007). Sin embargo, y contrariamente a lo que se ha sugerido (Shaw, 2006), hemos demostrado que el aumento en la glucólisis mediado por Akt es independiente de AMPK, estando posiblemente mediado por mTOR (Thompson y Thompson, 2004). Recientemente, se ha descrito que Akt se trasloca a la mitocondria y allí fosforila a β -F₁-ATPasa (Bijur y Jope, 2003). En este sentido, la fosforilación de β -F₁-ATPasa podría conducir a la inactivación de β -F₁-ATPasa, lo que podría explicar la disminución de la fosforilación oxidativa y el consiguiente aumento de la glucólisis en células que experimentan una activación oncogénica de AKT. Sin embargo, nuestros resultados con células de melanoma no apoyan que β -F₁-ATPasa sufra modificaciones covalentes por la activación de Akt.

Los oncogenes MYC y RAS, que se encuentran activados en numerosos tumores, han sido implicados en la activación directa de la glucólisis aeróbica mediante activación transcripcional de numerosos genes glucolíticos (Kim y Dang, 2005; Shaw y Cantley, 2006) (Figura 5.1). Aunque parezca paradójico, la activación de MYC en un modelo de células B humanas incrementa la respiración mitocondrial al favorecer la biogénesis de la mitocondria mediada por transactivación de PGC-1 β y Tfam (Li y cols., 2005) (Figura 5.1). De forma congruente con estos resultados, la activación de los oncogenes PDGF y RAS en los tipos celulares que hemos estudiado conduce a un aumento en el potencial bioenergético mitocondrial, y consecuentemente, a una disminución del flujo glucolítico celular por un mecanismo que actualmente desconocemos.

Se conocen diferentes vías de estabilización de HIF-1 α en situaciones no hipóxicas mediadas por señalización oncogénica (MYC, RAS, SRC) (Kim y Dang, 2006) que podrían explicar o incluso intensificar el efecto Warburg (Figura 5.1). Además, se ha visto que HIF-1 α disminuye la respiración mitocondrial al inducir la expresión de la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1), que inhibe por fosforilación la piruvato deshidrogenasa (PDH), reduciendo así la entrada de piruvato en el ciclo de Krebs (Papandreou y cols., 2006; Kim y cols., 2006) (Figura 5.1). Sin embargo, también se ha cuestionado el papel de HIF-1 α como inductor de la glucólisis en oncogénesis ya que su activación constitutiva suprime el crecimiento de tumores (Mack y cols., 2003; Bui y Thompson, 2006) y la inhibición de la PDH podría limitar la fuente de acetilCoA citosólico necesario para la síntesis de lípidos e isoprenoides (Bauer y cols., 2005; Bui y Thompson, 2006) (Figura 5.1). Muy recientemente, se ha descrito que HIF-1 inhibe la biogénesis de la mitocondria porque

estimula la transcripción de MXI-1 que es un represor de la actividad transcripcional de c-myc (Zhang y cols., 2007) (Figura 5.1).

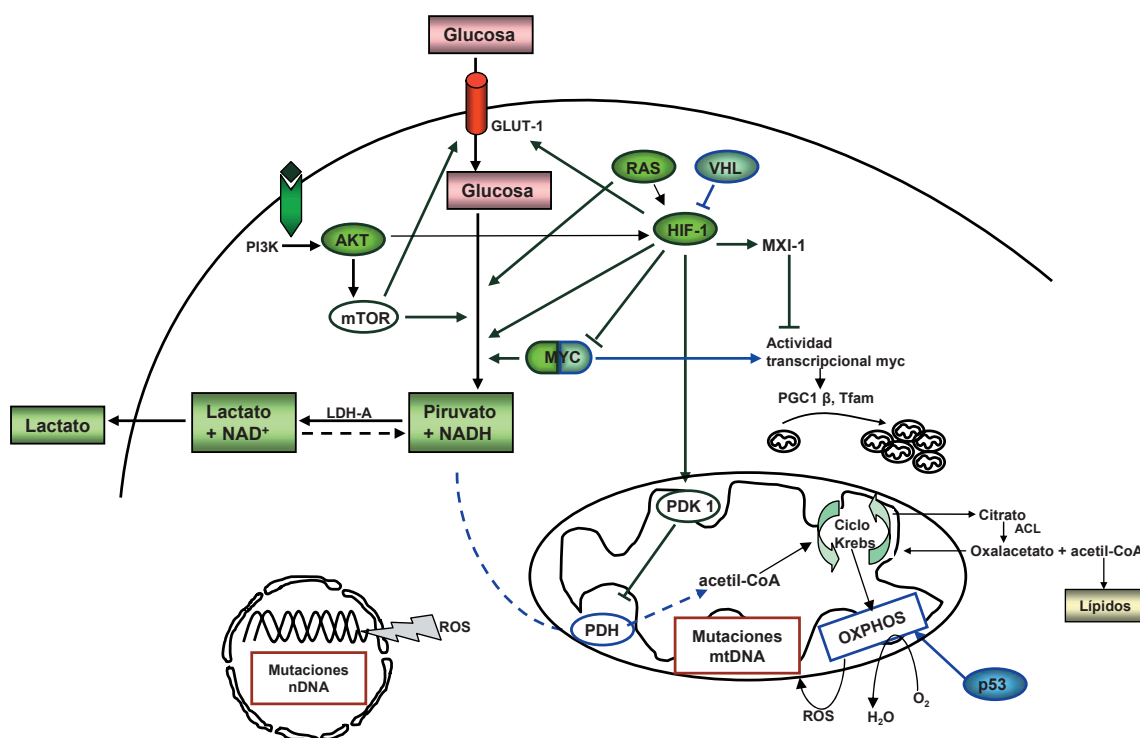


Figura 5.1. **El efecto Warburg en cáncer.** El efecto Warburg describe el aumento de la glucólisis en las células tumorales. El entorno hipóxico del tumor induce la activación de HIF-1 α que favorece el transporte de glucosa, transactiva genes glucolíticos y activa directamente el gen PDK1, el cual inhibe a PDH que cataliza la conversión de piruvato a acetil-CoA. El acetil-CoA entra en el ciclo de Krebs que dona electrones a la cadena respiratoria. La inhibición de PDH por PDK1 atenúa la función mitocondrial, resultando en un aumento de la transformación del piruvato a lactato. En las células cancerígenas parte del piruvato producido en exceso es convertido en lípidos a través de un ciclo de Krebs truncado. El aumento de la glucólisis en tumores puede ocurrir incluso en presencia de O₂ mediante la activación de HIF-1 α por oncogenes (RAS y AKT). Además, la activación de los oncogenes AKT y RAS también promueve un aumento del transporte de glucosa y de la glucólisis. El oncogén MYC favorece a la vez la glucólisis mediante la activación de genes glucolíticos y la biogénesis mitocondrial mediante la transactivación de PGC1 β y Tfam. HIF-1 α media la inhibición de C-MYC y la activación de MXI-1, que inhibe la actividad transcripcional de C-MYC, resultando en una inhibición de la biogénesis de la mitocondria. En este sentido, niveles altos de C-MYC podrían favorecer la producción de ROS que pueden causar mutaciones en el mtDNA y nDNA que favorecen la disfunción de la mitocondria. La pérdida de función de genes supresores de tumores también favorece la glucólisis aeróbica. Así la inactivación de VHL permite la activación de HIF-1 α y la inactivación de p53 favorece la glucólisis ya que p53 estimula la respiración a través de la activación de un componente de la cadena respiratoria.

Más recientemente, se ha atribuido el fenotipo glucolítico de los tumores a la deficiencia de p53 (Kim y Dang, 2006; Ma y cols., 2007). Se ha descrito que el supresor de tumores p53 es esencial para la generación de ATP por fosforilación oxidativa porque p53 regula la expresión del gen SCO2, un gen necesario para el ensamblaje del complejo citocromo c oxidasa (Ma y cols., 2007) (Figura 5.1). Pero además de los efectos, directos o indirectos, mediados por oncogenes y genes supresores de tumores en el fenotipo del metabolismo energético celular, también se ha descrito la selección de tumores más agresivos por hipoxia (Graeber y cols., 1996). En este sentido, los resultados de esta tesis muestran que

existe un cambio en el fenotipo energético de la célula durante el proceso de tumorigénesis que es independiente del oncogén que haya sido activado. Así, los tumores obtenidos de células que expresan los oncogenes PDGF y EBV muestran alteraciones moleculares y funcionales del metabolismo energético respecto de las células parentales originarias. Además, la inhibición de la actividad tirosina quinasa del receptor de PDGF con Gleevec no inhibe el fenotipo glucolítico, sino que incluso lo aumenta, lo que sugiere que el cambio en el fenotipo metabólico de la célula tumoral puede no ser debido al efecto directo de un oncogén y responder más bien a un fenómeno de selección de células tumorales con un fenotipo más glucolítico.

La pregunta que surge ahora es ¿por qué la célula tumoral tiene una menor expresión de β -F₁-ATPasa? O dicho de otra manera, ¿por qué la célula tumoral disminuye la función bioenergética de sus mitocondrias? Recientemente, se ha demostrado que la actividad mitocondrial de la célula actúa como un supresor tumoral. Así, el aumento de la actividad mitocondrial por sobre-expresión de frataxina en cánceres de colon previene la progresión tumoral (Schulz y cols., 2006), mientras que la disminución de la actividad mitocondrial mediante *Knock-Out* de frataxina en el hígado favorece la generación de hepatocarcinomas (Thierbach y cols., 2005). Además, la ejecución de la muerte celular requiere una fosforilación oxidativa eficiente (Dey y Moraes, 2000; Kim y cols., 2002; Park y cols., 2004; Tomiyama y cols., 2006). En este sentido, la actividad de la fosforilación oxidativa es requerida para la toxicidad inducida por Bax en levaduras (Harris y cols., 2000) y el cribado genético en levaduras permitió la identificación de genes que pueden conferir un fenotipo resistente a Bax, identificando el complejo de la H⁺-ATP sintasa de la mitocondria indispensable para la muerte mediada por Bax (Matsuyama y cols., 1998). Además, la muerte mediada por Bax en levaduras es dependiente estrictamente de componentes mitocondriales tales como la subunidad β -F₁-ATPasa (Gross y cols., 2000). La resistencia a la apoptosis constituye un problema clínico importante debido a que defectos en las vías que conducen muerte contribuyen a la progresión tumoral (Reed, 1999). El estudio detallado a nivel molecular de los procesos de apoptosis, y de cómo algunos tipos celulares son capaces de evadirlos, se ha convertido en un campo de investigación básico para el diseño de estrategias terapéuticas específicas contra el cáncer (Kasibhatla y Tseng, 2003).

Las células llevan a cabo diferentes programas de muerte celular en respuesta a distintos estímulos (Jaattela, 2004). En esta tesis hemos analizado la muerte celular en respuesta a STS en células de hígado de rata. Muchos trabajos involucran al complejo mitocondrial de la H⁺-ATP sintasa en el programa de muerte celular (Harris y cols., 2000; Gross y cols., 2000; Matsuyama y cols., 2000). Los resultados presentados en esta tesis apoyan estos datos ya que la inhibición de la H⁺-ATP sintasa con dos inhibidores distintos que actúan sobre diferentes subunidades previene la muerte inducida por STS. La prevención de la muerte celular inducida por STS con inhibidores de la H⁺-ATP sintasa mitocondrial es específica y no se debe a efectos secundarios de los inhibidores sobre otras ATPasas celulares ya

que la inhibición de la H⁺-ATPasa de tipo V por bafilomicina estimula la muerte celular (Santamaria y cols., 2006), de acuerdo con resultados recientes de otros autores (De Milito y cols., 2007).

Los constituyentes moleculares que están relacionados con la morfología y dinámica mitocondrial juegan un papel fundamental en el control de la ejecución de la muerte celular programada (von Ahsen y cols., 2000; Frank y cols., 2001; Jagasia y cols., 2005), aunque parece que los cambios morfológicos ocurridos durante la apoptosis dependen de la señal inductora de muerte (Perfettini y cols., 2005). El evento más temprano que ocurre tras el tratamiento de las células con STS es el desmantelamiento de la red mitocondrial en orgánulos puntiformes. La oligomicina es incapaz de prevenir los cambios morfológicos que ocurren en la mitocondria tras el tratamiento con STS. Sin embargo, la oligomicina retrasa la salida de citocromo c y la ejecución de la muerte en respuesta a STS, sugiriendo que el desmantelamiento de la red mitocondrial no es suficiente para comprometer a la célula a muerte y que la H⁺-ATP sintasa participa en la generación de una señal de muerte celular que actúa posteriormente a este evento.

Como se ha descrito previamente por otros autores (Scarlett y cols., 2000; Matsuyama y cols., 2000), los resultados de esta tesis demuestran que la STS promueve un aumento temprano de la retención de TMRM⁺ en la mitocondria consistente con un aumento del potencial de membrana de la mitocondria ($\Delta\psi_m$). El incremento en la retención de TMRM⁺ no parece ser debido a cambios en la masa mitocondrial ni al aumento del volumen de la mitocondria que ocurre tras el tratamiento con STS ya que el tratamiento de las células con oligomicina más STS causó cambios similares en la morfología de las mitocondrias pero previno el aumento en la retención de TMRM⁺. El aumento de $\Delta\psi_m$ tras el tratamiento con STS probablemente esté provocado por la inhibición de la respiración celular en respuesta a STS (Rego y cols., 2001). Se ha descrito que tras la inhibición de la respiración mitocondrial el ATP generado por glucólisis mantiene el $\Delta\psi_m$ (Nicholls y Ward, 2000; Matsuyama y cols., 2000; Almeida y cols., 2001). En esta situación, la H⁺-ATP sintasa se ve forzada a hidrolizar ATP generando ADP³⁻ en la matriz que puede ser intercambiado por el ATP⁴⁻ generado por la glucólisis en el citosol. El intercambio electrogénico de nucleótidos por la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT) y la actividad bombeara de protones de la H⁺-ATP sintasa soportada por la hidrólisis de ATP podrían contribuir al mantenimiento de un elevado $\Delta\psi_m$ en una fase temprana tras el tratamiento con STS (Nicholls y Ward, 2000; Matsuyama y cols., 2000; Almeida y cols., 2001; Santamaria y cols., 2006). De hecho, la inhibición de la actividad de la H⁺-ATP sintasa con oligomicina previene el aumento de $\Delta\psi_m$ después del tratamiento con STS.

Resultados previos de nuestro laboratorio han mostrado que la H⁺-ATP sintasa participa en la generación de una señal temprana de ROS tras el tratamiento de células hepáticas con STS (Santamaria y cols., 2006). En efecto, la inhibición de la H⁺-ATP sintasa con oligomicina previene la producción de ROS tras el tratamiento con STS (Santamaria y cols.,

2006). La producción de ROS por la mitocondria está íntimamente ligada a la magnitud del gradiente electroquímico de protones (Votyakova y Reynolds, 2001; Brand y cols., 2004). Los resultados muestran que esta producción de ROS tras el tratamiento con STS es efectivamente dependiente de $\Delta\psi_m$ al titular el gradiente de H^+ con el desacoplante FCCP. Hemos sugerido que los ROS están siendo producidos por un transporte en reverso de los electrones desde el Complejo II al Complejo I ya que la rotenona inhibe su producción en respuesta a STS (Lambert y Brand, 2004; Brand y cols., 2004; Santamaria y cols., 2006).

Los resultados mostrados en esta tesis indican que la generación de ROS en respuesta a STS precede la salida de citocromo c de la mitocondria. De hecho, al bloquear el aumento de $\Delta\psi_m$ con oligomicina se previene la generación de ROS y se atenúa la salida de citocromo c y la consecuente activación de caspasa 3 retrasando en definitiva la ejecución de la muerte celular (Santamaria y cols., 2006). La relación causa efecto entre producción de ROS y salida de citocromo c queda de manifiesto al apantallar los ROS generados por el tratamiento con STS con el antioxidante PDTC que disminuye la salida de citocromo c y la ejecución de la muerte celular. No podemos excluir que el PDTC pueda tener efectos adicionales sobre las caspasas (Chandra y cols., 2000), ya que en presencia del mismo se bloquea completamente la activación de caspasa 3 y la muerte celular.

Los radicales de oxígeno producen daño oxidativo a los constituyentes de la célula (lípidos, proteínas y DNA) así como alteraciones en las vías de transmisión de señales que controlan la expresión de genes requeridos para la ejecución de la muerte celular (Chandra y cols., 2000; Klaunig y Kamendulis, 2004). De forma consistente con el hecho de que ROS desempeña un papel fundamental en la muerte celular programada, en esta tesis se muestra como los ROS generados tras el tratamiento de las células con STS promueven la carbonilación de las proteínas celulares, así como la modificación covalente de proteínas mitocondriales (Santamaria y cols., 2006). Estas modificaciones son prevenidas por la oligomicina, lo que demuestra la relevancia de la H^+ -ATP sintasa en el control de modificaciones en los constituyentes mitocondriales. Es decir, proponemos que ROS intervienen en la liberación de citocromo c por modificar covalentemente constituyentes mitocondriales implicados en su liberación (Ka y cols., 2003; Santamaria y cols., 2006). En este sentido, se ha descrito como la disminución de ROS se encuentra asociada con el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática y con la externalización de fosfatidilserina (Ricci y cols., 2004). Además, la respuesta a muerte celular producida por STS parece depender de la contribución relativa de la fosforilación oxidativa a la provisión de energía metabólica de la célula (Tomiya y cols., 2006; Santamaria y cols., 2006). En su conjunto, estos resultados indican que la generación de ROS no son un epifenómeno de la muerte celular y sí una señal requerida (Martinvalet y cols., 2005) para la ejecución eficiente de la muerte celular en células dependientes de la fosforilación oxidativa (Santamaria y cols., 2006).

La generación de ROS es un proceso fisiológico que depende de la actividad respiratoria

mitocondrial, determinando la vida de las células y del organismo (Lee y cols., 2003). Por otro lado, la glucólisis, la vía alternativa de generación de energía de la célula, también está integrada con la apoptosis (Plas y Thompson, 2002; Danial y cols., 2003; Azoulay-Zohar y cols., 2004; Vahsen y cols., 2004; Pospisilik y cols., 2007). Por ello, hemos propuesto (Santamaria y cols., 2006) que las células que dependen de la glucólisis para la provisión de energía poseen un fenotipo resistente a apoptosis similar al de células ρ^0 (Dey y Moraes, 2000; Kim y cols., 2002; Park y cols., 2004). Por contra, las células que dependen de la fosforilación oxidativa señalizan la muerte celular por vía de ROS (Santamaria y cols., 2006), aunque otros autores contradigan la implicación de los ROS en la señalización de la muerte (Tomiyama y cols., 2006). En esta situación, no resulta sorprendente que la expresión de la H^+ -ATP sintasa se encuentre disminuida en la mayoría de los tumores humanos mientras que la expresión de algunas proteínas de la vía glucolítica muestran un patrón de expresión aumentado (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005). Esta condición metabólica, en definitiva, proporciona a la célula tumoral un fenotipo bioenergético ventajoso ya que el potencial de producción de ROS se encuentra disminuido modificando negativamente el umbral para la inducción de la muerte celular, mientras que el metabolismo glucolítico podría soportar la demanda energética que permite la proliferación celular y la expansión del tumor.

5.2. Biogénesis y dinámica de la mitocondria durante el ciclo celular: papel del 3'UTR de β -F₁-ATPasa en la síntesis de la proteína.

La biogénesis de la mitocondria es un evento celular complejo que requiere la expresión concertada de dos genomas separados físicamente (Garesse y Vallejo, 2001; Scarpulla, 2002). Sin embargo, y a pesar del papel que desempeña la mitocondria en la generación y progresión de patologías humanas (Wallace, 2005b), se conoce muy poco de cuándo ocurre la biosíntesis de los diferentes constituyentes de la mitocondria y de los mecanismos que controlan su biosíntesis durante la proliferación celular. Aún menos se conoce acerca del dinamismo y de la morfología de la mitocondria durante la mitosis, un proceso muy importante para el desarrollo de la función mitocondrial y para la correcta segregación de los orgánulos durante la división. En esta tesis hemos estudiado estos aspectos de la mitocondria en el ciclo celular por la reciente implicación de la mitocondria en la biología del cáncer (Cuezva y cols., 2002; Isidoro y cols., 2004; Garber, 2006).

Recientemente, se ha abierto un debate sobre el mecanismo de replicación del mtDNA (Yasukawa y cols., 2005). El modelo tradicional propone una replicación asincrónica de las hebras, donde cada una de las hebras del genoma circular de la mitocondria se replica semi-independientemente (Clayton, 1982). Más recientemente, se ha descrito otro modelo que propone una replicación bidireccional acoplada de las dos hebras, donde se incorporan RNAs cebadores en la hebra retrasada (Reyes y cols., 2005; Yasukawa y cols., 2006). Asimismo, el momento de la síntesis de mtDNA en células de mamíferos durante la progresión del

ciclo celular es igualmente objeto de debate. Se ha descrito como la replicación del mtDNA se produce de manera continua a lo largo del ciclo celular (Bogenhagen y Clayton, 1977; Magnusson y cols., 2003) o que ocurre específicamente en un momento del ciclo celular (entre las fases S-G₂/M) cuando la síntesis de nDNA ya ha sido completada (Posakony y cols., 1977; Radsak y Schutz, 1978). Los resultados que se muestran en esta tesis, donde no se aprecian cambios significativos en la razón mtDNA/nDNA, sugieren que la síntesis de los dos genomas se encuentra coordinada a lo largo del ciclo celular apoyando además la existencia de una transactivación concertada de la replicación de los mismos (Ruiz De Mena y cols., 2000). Esta síntesis se realizaría en la “fase reductiva” del ciclo con objeto de proteger el genoma de los efectos deletéreos de los ROS (Chen y cols., 2007). Esta sincronización de la replicación de ambos genomas durante la proliferación es compatible con la síntesis localizada (Davis y Clayton, 1996) o deslocalizada (Magnusson y cols., 2003) del mtDNA de la célula las cuales podrían representar eventos de recambio y/o de reparación de mtDNA.

De forma congruente con el importante papel que desempeña la cardiolipina en la traducción de las proteínas mitocondriales y en la biogénesis de los complejos mitocondriales de la fosforilación oxidativa (Jiang y cols., 2000; Ostrander y cols., 2001; Zhang y cols., 2002), hemos observado que la síntesis de las proteínas COX I y COX IV, codificadas respectivamente en el genoma mitocondrial y nuclear, se lleva a cabo y se completa en la fase S del ciclo celular. Esta es la fase del ciclo que coincide con la síntesis de cardiolipina. Sin embargo, hemos observado que el desarrollo máximo del $\Delta\psi_m$ no se alcanza hasta la fase G₂/M de acuerdo con lo descrito por otros autores (Sweet y Singh, 1999). Se ha descrito que el ensamblaje y la oligomerización de la H⁺-ATP sintasa juega un papel importante en el plegamiento de la membrana interna de la mitocondria y que es responsable de originar la morfología de las crestas (Paumard y cols., 2002; Lefebvre-Legendre y cols., 2005; Minauro-Sanmiguel y cols., 2005). Además, en levaduras, la actividad ATPasa es requerida para el mantenimiento de la integridad mitocondrial y del mtDNA (Lefebvre-Legendre y cols., 2003). Estas observaciones nos llevan a sugerir que la síntesis de β -F₁-ATPasa, y quizás de otras proteínas de la fosforilación oxidativa cuya síntesis se produzca en la fase G₂/M, limitarían el desarrollo de un orgánulo funcional durante la proliferación celular.

Se ha descrito que la regulación de la expresión de genes nucleares y mitocondriales durante el ciclo celular se ejerce por control de la transcripción (Luciakova y cols., 1992; Kim y cols., 2001; Scarpulla, 2002) y por cambios en la vida media de los mRNAs (Scarpulla, 2002; Kindy y cols., 1991; Lunardi y Attardi, 1991; Luciakova y cols., 1992). Sin embargo, la acumulación de β -F₁-ATPasa durante el ciclo celular ocurre en ausencia de cambios en la cantidad relativa de su mensajero de acuerdo con el control traduccional que se ha descrito para este transcrito (Tvrđik y cols., 1992; Luis y cols., 1993; Izquierdo y cols., 1995; López de Heredia y cols., 2000). Además, hemos demostrado que el 3'UTR de β -mRNA dirige la expresión de una proteína reportera (gfp) recapitulando el mismo patrón y mecanismo de

expresión que la proteína endógena durante la progresión celular. Estos resultados indican, por vez primera en el contexto de la biogénesis de la mitocondria, que se requiere de la traducción en la fase G₂/M del ciclo celular para la síntesis de componentes esenciales de la mitocondria. Además, apoyan que cambios en la eficiencia traducional de mRNAs de la fosforilación oxidativa dependientes de ciclo celular juegan un papel muy importante para la biogénesis de la mitocondria.

La traducción cap-dependiente es inhibida durante la mitosis como resultado de múltiples eventos que conllevan a la disrupción del complejo eIF4F (Pyronnet y Sonenberg, 2001). En esta fase del ciclo celular la traducción cap-independiente de mRNAs con secuencias IRES dirige la síntesis de proteínas que son fundamentales para la progresión del ciclo (Pyronnet y cols., 2000; Cornelis y cols., 2000; Qin y Sarnow, 2004). De forma congruente, hemos demostrado que la síntesis de β -F₁-ATPasa tiene una menor dependencia por eIF4E que otros mensajeros celulares (Izquierdo y Cuezva, 2000). Además, la región 3'UTR de β -mRNA actúa como secuencia intensificadora de la traducción (Izquierdo y Cuezva, 1997; Di Liegro y cols., 2000) mostrando actividad IRES en construcciones dicistrónicas (Izquierdo y Cuezva, 2000). Por lo tanto, una conclusión que se deriva de los resultados de esta tesis es que el IRES localizado en el 3'UTR de β -mRNA es la diana de la regulación de la traducción dependiente de ciclo celular.

El mensajero de β -F₁-ATPasa fue el primer transcrito de la mitocondria codificado en el núcleo que se describió localizado y unido a la membrana externa de la mitocondria (Ricart y cols., 1997; Egea y cols., 1997; Lithgow y cols., 1997; Santamaria y Cuezva; no publicados). La localización/traducción de este mRNA requiere dos elementos, uno localizado en la región codificante y otro en la región 3'UTR (Ricart y cols., 2002). El elemento localizado en la región codificante ejerce un control negativo de la traducción (Izquierdo y Cuezva, 1997). Para una traducción eficiente de β -mRNA se requiere de la actividad IRES de la región 3'UTR (Izquierdo y Cuezva, 1997; Izquierdo y Cuezva, 2000). Esta actividad intensificadora de la traducción de la región 3'UTR de β -mRNA también ha sido observada en otros mensajeros de la fosforilación oxidativa tanto en células de mamífero (Di Liegro y cols., 2000) como en levaduras (Sylvestre y cols., 2003). De hecho, la eliminación de la región 3'UTR del gen de β -F₁-ATPasa en levaduras provoca la generación de células con deficiencia respiratoria (Margeot y cols., 2002) aunque este fenotipo ha sido atribuido a una importación deficiente de β -F₁-ATPasa más que a la actividad de la región 3'UTR en la traducción. La relevancia de 3'UTR de β -F₁-ATPasa para la correcta fisiología de la levadura nos puede explicar, al menos parcialmente, la imposibilidad que hemos tenido para desarrollar un ratón con una delección genética de la región 3'UTR del gen de β -F₁-ATPasa (Martínez-Díez y cols., 2006).

En tumores humanos (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005), la expresión relativa de β -F₁-ATPasa se encuentra disminuida respecto del correspondiente tejido normal. Sin embargo, la expresión relativa del β -mRNA

en diferentes tejidos tumorales humanos está aumentada como se pone de manifiesto mediante *Northern-blots* virtuales (Lal y cols., 1999) o por datos de microarrays (<http://www.oncomine.org>). Este hecho sugiere la existencia de un control estricto de la traducción de β -mRNA en la célula tumoral tal y como se ha descrito en hepatocarcinomas de rata (de Heredia y cols., 2000) y en el hígado fetal (Cuezva y cols., 1997). Los mecanismos que controlan la traducción de β -mRNA son muy complejos (Cuezva y cols., 1997; López de Heredia y cols., 2000; Ricart y cols., 2002). La represión de la traducción de β -mRNA está asociada con el aumento de la actividad de proteínas de unión al mensajero (Cuezva y cols., 1997; López de Heredia y cols., 2000; Ricart y cols., 2002). Se ha propuesto que la interacción de estas proteínas con el 3'UTR impide estéricamente la función de éste en traducción (Cuezva y cols., 2007) de manera que la identificación molecular de estas proteínas, así como de los factores que regulan su actividad de unión al RNA son necesarias para entender el fenotipo bioenergético de la célula tumoral.

Las proteínas de unión a la región 3'UTR de β -mRNA que regulan la traducción del transcrito durante el desarrollo del hígado (Izquierdo y Cuezva, 1997) y en oncogénesis (López de Heredia y cols., 2000) poseen fundamentalmente una actividad de unión a poli A (Izquierdo y Cuezva, 2005). Uno de los objetivos de nuestro laboratorio es la identificación de la naturaleza molecular de estas proteínas de las que se han empezado a caracterizar algunas de ellas (Izquierdo, 2006; Reyes y Izquierdo, 2007; Ortega y cols., en revisión). Sin embargo, sí se conoce que tanto un entorno reducido como una razón ATP/ADP baja favorecen la unión de estas proteínas a β -mRNA (Izquierdo y Cuezva, 2005), lo cual resulta en una disminución de la traducción del transcrito (Luis y cols., 1993; Izquierdo y Cuezva, 1997; López de Heredia y cols., 2000). Recientemente, se ha descrito que la progresión a través del ciclo celular está controlada por la regulación de las vías metabólicas involucradas en la generación de la energía (Klevecz y cols., 2004; Reinke y Gatfield, 2006; Chen y cols., 2007). El “ciclo metabólico” durante la proliferación celular alterna entre una “fase oxidativa”, que se caracteriza por la biosíntesis de algunos componentes celulares (fase G_1) con la energía producida por la mitocondria, y una “fase reductora” donde tiene lugar la replicación del DNA y la biosíntesis de la mitocondria (fases S/ G_2 /M) usando la energía producida por vías no respiratorias (Klevecz y cols., 2004; Reinke y Gatfield, 2006). La existencia del “ciclo metabólico” en células de mamífero ha sido apoyada recientemente con el descubrimiento de la actividad represora de la función mitocondrial por la ciclina D1 (Wang y cols., 2006; Sakamaki y cols., 2006). En este contexto, sugerimos que el control de la traducción de β -mRNA en la fase reductora que prevalece en G_2 /M debe tener factores adicionales que controlen la interacción de las proteínas de unión a la región 3'UTR para poder permitir la traducción del mensajero en una situación tan desfavorable energéticamente. Puesto que la expresión de β -F₁-ATPasa se encuentra disminuida en la mayoría de los tumores humanos (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005) sugerimos que estos reguladores

son los responsables de promover la alteración del fenotipo bioenergético de las células cancerígenas. Obviamente, no podemos excluir la posibilidad de que la disminución observada de la expresión de β -F₁-ATPasa en cáncer podría también ser consecuencia de una degradación exacerbada de la proteína en las células tumorales.

Tradicionalmente, se ha venido relacionando el plegamiento de las crestas de la membrana interna y la condensación de la matriz de la mitocondria con su estado bioenergético (Hackenbrock, 1966; Valcarce y cols., 1988). En concreto, alteraciones en la morfología de las crestas acompañan a la disfunción del metabolismo energético (John y cols., 2005). Recientemente, se han establecido relaciones entre el estado bioenergético de la célula y la maquinaria de fusión-fisión (Bach y cols., 2003; Chen y Chan, 2005) de manera que una elevada respiración de la célula está correlacionada con una red interconectada de mitocondrias con un elevado número de crestas, mientras que una baja actividad de la fosforilación oxidativa correlaciona con mitocondrias pequeñas con espacios intracrestas muy pequeños (Detmer y Chan, 2007). Los resultados de esta tesis relativos a la morfología de la mitocondria durante las distintas fases de la mitosis están de acuerdo con resultados de otros autores (Barni y cols., 1996; Margineantu y cols., 2002) que han mostrado que en fibroblastos y células de osteosarcoma la mitocondria se vuelve filamentosa e interconectada durante la fase G₁, mientras que su apariencia es fragmentada en fase S.

Estudios recientes muestran que los procesos de fusión y división de la mitocondria tienen consecuencias importantes en la morfología, función y distribución de la orgánulo (Detmer y Chan, 2007). Los resultados de esta tesis nos hacen presumir que los rápidos cambios que ocurren en la morfología y dinámica mitocondrial en la fase de mitosis podrían tener relevancia para la correcta segregación de los orgánulos y el mtDNA en las células hijas durante la proliferación. La fisión de la mitocondria es un evento temprano en la mitosis que podría responder a las cascadas de señalización que acompañan a la progresión durante el ciclo celular. La fisión de la mitocondria es llevada a cabo mediante la degradación proteosomal de mitofusinas (Suzuki y cols., 2005). Funcionalmente, la fisión de las mitocondrias proporciona una distribución aleatoria de las organelas entre las dos células hijas por procesos que podrían estar controlados y mediados por microtúbulos (Nishida y cols., 2005). Sin embargo, se ha descrito que tras la fisión el 25-40% de las mitocondrias carece de mtDNA (Legros y cols., 2004). Esta situación podría contribuir a la segregación asimétrica del mtDNA entre las células hijas, lo que podría explicar ciertos síndromes de depleción celular de mtDNA (Okamoto y Shaw, 2005). Sin embargo, la fusión de las mitocondrias que hemos descrito en telofase tardía, justo antes de la citocinesis, un proceso que se encuentra controlado por mitofusinas y el desarrollo del $\Delta\psi_m$ (Legros y cols., 2004), probablemente contribuye a evitar la posible distribución desigual del mtDNA durante la proliferación celular.

5.3. La H⁺-ATP sintasa no se encuentra localizada en la membrana plasmática.

Un dogma establecido de la biología celular es que en la H⁺-ATP sintasa de tipo F se encuentra exclusivamente en la membrana interna de las mitocondrias. Recientemente, se ha descrito la presencia de diferentes componentes de este tipo de ATPasas en la cara externa de la membrana plasmática donde actuarían como receptores de diferentes ligandos y participarían en diversos procesos (Chi y Pizzo, 2006). En este sentido, se ha descrito la presencia de la subunidad catalítica β -F₁-ATPasa en la superficie de varias líneas celulares tumorales donde se ha sugerido que β -F₁-ATPasa es reconocida por las células NK (*Natural Killer*) lo que originaría un ligando natural de citolisis (Das y cols., 1994). Apoyando esta función para β -F₁-ATPasa, se ha observado que la citotoxicidad de las células tumorales es bloqueada por subunidades solubles de β -F₁ (Das y cols., 1994).

Más recientemente, se ha postulado que la angiostatina se une a F₁F₀-ATP sintasa localizada en la membrana plasmática de células endoteliales dirigiendo la inhibición de la migración y proliferación (Moser y cols., 1999; Arakaki y cols., 2003; Burwick y cols., 2005; Chi y cols., 2007) y activando apoptosis caspasa dependiente de este tipo celular (Veitonmaki y cols., 2004). De hecho, la inhibición de la ATP sintasa en la membrana usando anticuerpos contra las distintas subunidades mimetizó la acción antiproliferativa de la angiostatina (Moser y cols., 1999; Moser y cols., 2001; Chi y cols., 2007). Asimismo, se ha descrito que la síntesis de ATP en la membrana se inhibe usando inhibidores de la H⁺-ATP sintasa como el resveratrol, el piceatanol, las efraeptinas y la oligomicina (Arakaki y cols., 2003). También se ha descrito que el inhibidor fisiológico de la H⁺-ATP sintasa, IF1, puede modular la proliferación de las células endoteliales (Burwick y cols., 2005). Estos resultados sugieren que la H⁺-ATP sintasa en la membrana de células endoteliales utiliza el gradiente electroquímico de protones para sintetizar ATP (Chi y Pizzo, 2006).

Por otro lado, el grupo de Barbaras ha propuesto que la subunidad catalítica de la H⁺-ATP sintasa es un receptor de alta afinidad para la apolipoproteína A-I (ApoA-I) que se encuentra localizado en la membrana plasmática de hepatocitos porcinos, de rata y humanos, así como en células HepG2 y que media la endocitosis de HDL (Martinez y cols., 2003). Esta función se inhibe por anticuerpos contra β -F₁-ATPasa, que presumiblemente impiden la unión de ApoA-I al receptor, y por IF1, que inhibe la hidrólisis de ATP necesaria para el proceso de endocitosis que es dependiente de ADP (Martinez y cols., 2003).

Finalmente, se ha descrito la presencia de la H⁺-ATP sintasa en la membrana de células neuronales donde se une a la proteína precursora del β -amiloide (APP) y al péptido β -amiloide (A β) (Schmidt y cols., 2007). Anteriormente, ya se había descrito la presencia de α -F₁-ATPasa en los *tangles* neurofibrilares característicos en los pacientes de Alzheimer (Sergeant y cols., 2003). En todos los casos, la orientación del complejo F₀F₁-ATPasa en la membrana plasmática es tal que la producción o hidrólisis de ATP ocurre en la superficie celular (Moser y cols., 1999; Moser y cols., 2001; Martinez y cols., 2003; Arakaki y cols., 2003).

En esta tesis se muestran resultados que contradicen la presencia de β -F₁-ATPasa en la membrana plasmática de distintos tipos celulares mediante el uso de diferentes aproximaciones experimentales como son las técnicas de fraccionamiento subcelular, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunomicroscopía electrónica y de citometría de flujo, empleando cuatro anticuerpos diferentes: un anticuerpo monoclonal comercial (Ab1) y dos anticuerpos policlonales (Ab2 y Ab3) y uno monoclonal (Ab4) generados en el laboratorio. Los experimentos se han realizado en tres tipos celulares diferentes: en hepatocarcinomas (HepG2), en células endoteliales (HMEC-1) y tumorales (A549) (datos no mostrados), y en tumores humanos de hígado y en hígado de rata. En ninguno de los casos estudiados nuestros resultados evidencian la localización de β -F₁-ATPasa en la membrana plasmática, mientras que sí se identifica claramente su expresión subcelular restringida a la mitocondria. Esto significa que se dispone de un control positivo interno en cada técnica empleada que valida la ausencia de señal en membrana con los diferentes anticuerpos.

Nuestros resultados contradicen los trabajos citados anteriormente que apoyan una localización ectópica de β -F₁-ATPasa. En este sentido, es importante destacar una serie de consideraciones técnicas que podrían justificar esta discrepancia. La proteína β -F₁-ATPasa es muy abundante en la célula y en la purificación de la proteína de unión a angiostatina (Moser y cols., 1999) o a HDL (Martínez y cols., 2003) no se incluyen controles de contaminación cruzada con otras proteínas mitocondriales en las fracciones de membrana plasmática que se han empleado para la purificación. Según los datos de citometría de flujo del grupo de Barbaras estimamos que la cantidad de esta proteína presente en la membrana plasmática de células de hígado debe ser del orden del 20% del total (Martínez y cols., 2003). Nuestros resultados de fraccionamiento subcelular, que sí incluyen marcadores de contaminación de mitocondria en la membrana plasmática, ilustran un enriquecimiento de dicha fracción más que suficiente para detectar unos niveles tan elevados de β -F₁-ATPasa. Sin embargo, no se observa ninguna señal con ninguno de los cuatro anticuerpos empleados.

Por otro lado, es posible que la actividad receptor de angiostatina (Moser y cols., 1999) o de ApoA-I (Martínez y cols., 2003) sea debida a proteínas homólogas a la H⁺-ATP sintasa de tipo F como ya ha sugerido algún autor (Das y cols., 1994). Así, se ha descrito que alguna de estas ATPasas son sensibles también a oligomicina (Swarts y cols., 2005). Además, se ha descrito la presencia de H⁺-ATPasas de tipo V en la superficie de células endoteliales (Rojas y cols., 2006) y tumorales (Sennoune y cols., 2004). Debido a la homología existente entre H⁺-ATPasas de tipo V y F, lo que da lugar a un alto grado de identidad aminoacídica en determinadas regiones de la estructura primaria de sus subunidades (Alconada y cols., 1994), no se puede descartar una reactividad del anticuerpo utilizado en esos casos (Moser y cols., 1999; Martínez y cols., 2003) con el complejo vacuolar. Así, nuestro laboratorio demostró cómo anticuerpos generados contra péptidos de la subunidad α -F₁-ATPasa reconocían también otros chaperones celulares (Alconada y cols., 1994), algo que se atribuyó a una posible relación evolutiva entre estas familias proteicas (Alconada y

cols., 1994; Flores y cols., 1997). Otra posibilidad es que los anticuerpos utilizados para la inmunolocalización de la proteína no fuesen lo suficiente específicos. De hecho, se ha descrito que muchos anticuerpos monoclonales presentan reactividad cruzada con otras proteínas (Michaud y cols., 2003).

Por otro lado, debemos destacar otros aspectos que pueden ser relevantes a la hora de explicar estas diferencias. En los trabajos de Moser y cols. y Martínez y cols. se usa una concentración del anticuerpo (5 $\mu\text{g/ml}$) notablemente superior a la que usamos nosotros (2 $\mu\text{g/ml}$), lo que podría favorecer una tinción inespecífica del anticuerpo en la membrana plasmática, originando la cantidad de señal que presentan estos autores en la membrana plasmática. Además, el método de fijación empleado (3% paraformaldehído) induce una elevada permeabilización de las células, lo que favorece la detección de material inmunorreactivo en el interior celular. De hecho, hay que destacar que en nuestro caso con una fijación de 1% de paraformaldehído la citometría de flujo en células no permeabilizadas es negativa en células HMEC y ligeramente positiva en HepG2, debido a la permeabilización parcial inevitable que sufren este tipo de células durante el proceso de fijación como se demuestra por la tinción con yoduro de propidio.

Finalmente, la subunidad $\beta\text{-F}_1\text{-ATPasa}$ de la $\text{H}^+\text{-ATP}$ sintasa está codificada en un gen de copia única en los genoma humanos (Neckelmann y cols., 1987) y de rata (Izquierdo y cols., 1995). Estudios en hígado de rata han demostrado que la transcripción del gen durante el desarrollo del hígado genera una especie única de mRNA de aproximadamente 1,8 Kb (Izquierdo y cols., 1995) lo que descarta la posibilidad de que en el hígado se produzca un transcrito de $\beta\text{-F}_1\text{-ATPasa}$ carente de la región codificante correspondiente a la presecuencia del precursor. Además, se ha visto que la traducción del mensajero de $\beta\text{-F}_1\text{-ATPasa}$ genera un único producto proteico de ~ 52 KDa y de pI 5,5 unidades de pH tanto “*in vivo*” (Ricart y cols., 1997) como “*in vitro*” (Santaren y cols., 1993) que es el precursor de $\beta\text{-F}_1\text{-ATPasa}$. El precursor de $\beta\text{-F}_1\text{-ATPasa}$ es importado a la mitocondria y procesado por la peptidasa mitocondrial para generar la proteína madura de $\beta\text{-F}_1\text{-ATPasa}$ de la $\text{H}^+\text{-ATP}$ sintasa de ~ 49 KDa y de pI 5,3 unidades de pH (Santaren y cols., 1993). Los experimentos con quimeras de gfp que contienen la presecuencia de $\beta\text{-F}_1\text{-ATPasa}$ demuestran, además, que la proteína verde sólo se localiza en la mitocondria. En su conjunto, estos resultados sugieren que no se produce una traducción alternativa del $\beta\text{-mRNA}$ que pueda generar una especie proteica madura extramitocondrial y que la proteína sintetizada sólo se localiza en mitocondria. Algunos autores sugieren que la localización extramitocondrial de $\beta\text{-F}_1\text{-ATPasa}$ se puede generar por fusión de la mitocondria con la membrana plasmática (Chi y Pizzo, 2006). Hasta el momento, no existe ninguna evidencia celular o molecular que apoye este modelo. En definitiva, concluimos que nuestros resultados no apoyan la localización ectópica de $\beta\text{-F}_1\text{-ATPasa}$ en la membrana plasmática de distintos tipos celulares estudiados y que su función biológica como receptor de angiotatina y ApoA-I es, cuando menos, muy discutible.



CONCLUSIONES

1- La expresión de los marcadores del metabolismo energético que definen la “huella bioenergética” está alterada en carcinomas de esófago y en melanomas. Por el contrario, no se observan alteraciones de la “huella bioenergética” en carcinomas de próstata. Los marcadores de la “huella bioenergética” permiten la discriminación molecular de melanomas primarios de sus metástasis así como la identificación de un grupo de pacientes con melanomas con peor pronóstico clínico.

2- El efecto de los oncogenes en el metabolismo y “huella bioenergética” celular es muy variado. Los oncogenes PDGF y RAS propician un aumento del potencial bioenergético de la mitocondria con la consiguiente represión de la glucólisis aeróbica mientras que el oncogén AKT tiene el efecto contrario. Por otro lado, las células rescatadas de tumores que expresan PDGF y EBV presentan una alteración de la “huella bioenergética” (PDGF y EVB) y un fenotipo metabólico más glucolítico (PDGF) que las células parentales, sugiriendo que la progresión tumoral propicia la selección de células con alteraciones de la funcionalidad bioenergética de la mitocondria.

3- La actividad de la H^+ -ATP sintasa es necesaria para la ejecución eficiente de la muerte celular en respuesta a estaurosporina. La H^+ -ATP sintasa está implicada en la generación de una señal temprana de muerte que implica la producción de radicales de oxígeno (ROS). Esta señal de ROS se produce en una fase posterior a los cambios morfológicos que experimenta la mitocondria tras la inducción de muerte y es necesaria para la liberación eficiente de citocromo c por la mitocondria. La liberación de citocromo c no implica al poro de transición. La señal de ROS, que es bloqueada por el antioxidante PDTC, promueve la carbonilación de proteínas celulares. Se sugiere que la oxidación y modificación covalente de proteínas mitocondriales, promovida por la señal de ROS, está implicada en la liberación de las moléculas pro-apoptóticas de la mitocondria.

4- Durante la proliferación celular la biosíntesis del mtDNA está sincronizada con la síntesis del nDNA. La biosíntesis de cardiolipina se produce en la fase S del ciclo celular mientras que en G2/M se produce la síntesis mayoritaria de las proteínas mitocondriales β - F_1 -ATPasa y Hsp60, estando la síntesis de la primera regulada por control de la traducción. Este momento del ciclo coincide con el desarrollo máximo del potencial de membrana de la mitocondria. Se ha demostrado que el 3'UTR del mRNA de β - F_1 -ATPasa es la diana que regula la síntesis de la proteína durante el ciclo celular. La generación de líneas celulares que expresan establemente gfp en la mitocondria ha permitido caracterizar la morfología y dinámica de la mitocondria durante la mitosis. Se ha puesto de manifiesto que los eventos de fisión de la mitocondria prevalecen en profase mientras que en telofase tardía prevalecen los eventos de fusión que conducen al cambio de morfología de la mitocondria.

CONCLUSIONES

5- El estudio por técnicas de inmunohistoquímica, microscopía electrónica y confocal, citometría de flujo y fraccionamiento subcelular empleando cuatro anticuerpos distintos generados contra la subunidad catálítica de la H^+ -ATP sintasa de la mitocondria (β - F_1 -ATPasa) no apoya la expresión ectópica de esta proteína en la membrana plasmática de hepatocitos, de células endoteliales y tumorales de pulmón. Por contra, los resultados indican que la localización de esta proteína es exclusivamente mitocondrial.



BIBLIOGRAFÍA

- Adams JM, Cory S (2001)** Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 26: 61-6.
- Alconada A, Flores AI, Blanco L, Cuezva JM (1994)** Antibodies against F1-ATPase alpha-subunit recognize mitochondrial chaperones. Evidence for an evolutionary relationship between chaperonin and ATPase protein families. *J Biol Chem* 269: 13670-9.
- Almeida A, Almeida J, Bolanos JP, Moncada S (2001)** Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated atp in astrocyte protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15294-9.
- Almeida AM, Bechara EJ, Vercesi AE, Nantes IL (1999)** Diphenylacetaldehyde-generated excited states promote damage to isolated rat liver mitochondrial dna, phospholipids, and proteins. *Free Radic Biol Med* 27 : 744-51.
- Alonso SR, Ortiz P, Pollan M, Perez-Gomez B, Sanchez L, Acuna MJ, Pajares R, Martinez-Tello FJ, Hortelano CM, Piris MA, Rodriguez-Peralto JL (2004)** Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol* 164: 193-203.
- Amuthan G, Biswas G, Ananadatheerthavarada HK, Vijayasarathy C, Shephard HM, Avadhani NG (2002)** Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. *Oncogene* 21: 7839-49.
- Amuthan G, Biswas G, Zhang SY, Klein-Szanto A, Vijayasarathy C, Avadhani NG (2001)** Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *EMBO J* 20: 1910-20.
- Anderson KM, Levin J, Jajeh A, Seed T, Harris JE (1993)** Induction of apoptosis in blood cells from a patient with acute myelogenous leukemia by sc41661a, a selective inhibitor of 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 48: 323-6.
- Antunes F, Cadenas E (2000)** Estimation of h₂o₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett* 475: 121-6.
- Antunes F, Salvador A, Marinho HS, Alves R, Pinto RE (1996)** Lipid peroxidation in mitochondrial inner membranes. I. An integrative kinetic model. *Free Radic Biol Med* 21: 917-43.
- Arakaki N, Nagao T, Niki R, Toyofuku A, Tanaka H, Kuramoto Y, Emoto Y, Shibata H, Magota K, Higuti T (2003)** Possible role of cell surface h⁺-atp synthase in the extracellular atp synthesis and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Mol Cancer Res* 1: 931-9.
- Arbiser JL, Govindarajan B, Bai X, Onda H, Kazlauskas A, Lim SD, Amin MB, Claesson-Welsh L (2002)** Functional tyrosine kinase inhibitor profiling: a generally applicable method points to a novel role of platelet-derived growth factor receptor-beta in tuberous sclerosis. *Am J Pathol* 161: 781-6.

- Arbiser JL, Yeung R, Weiss SW, Arbiser ZK, Amin MB, Cohen C, Frank D, Mahajan S, Herron GS, Yang J, Onda H, Zhang HB, Bai X, Uhlmann E, Loehr A, Northrup H, Au P, Davis I, Fisher DE, Gutmann DH (2001)** The generation and characterization of a cell line derived from a sporadic renal angiomyolipoma: use of telomerase to obtain stable populations of cells from benign neoplasms. *Am J Pathol* 159: 483-91.
- Arselin G, Vaillier J, Salin B, Schaeffer J, Giraud MF, Dautant A, Brethes D, Velours J (2004)** The modulation in subunits e and g amounts of yeast atp synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem* 279: 40392-9.
- Astuti D, Latif F, Dallol A, Dahia PL, Douglas F, George E, Skoldberg F, Husebye ES, Eng C, Maher ER (2001)** Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit sdhb cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am J Hum Genet* 69: 49-54.
- Attardi G, Schatz G (1988)** Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 4: 289-333.
- Azoulay-Zohar H, Israelson A, Abu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V (2004)** In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem J* 377: 347-55.
- Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Daugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacin M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A (2003)** Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 278: 17190-7.
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF (2001)** Final version of the american joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19: 3635-48.
- Barni S, Sciola L, Spano A, Pippia P (1996)** Static cytofluorometry and fluorescence morphology of mitochondria and dna in proliferating fibroblasts. *Biotech Histochem* 71: 66-70.
- Batandier C, Fontaine E, Keriel C, Leverve XM (2002)** Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects. *J Cell Mol Med* 6: 175-87.
- Bauer DE, Hatzivassiliou G, Zhao F, Andreadis C, Thompson CB (2005)** Atp citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene* 24: 6314-22.
- Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, van der Mey A, Taschner PE, Rubinstein WS, Myers EN, Richard CW3, Cornelisse CJ, Devilee P, Devlin B (2000)** Mutations in SDHD, a mitochondrial

- complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 287: 848-51.
- Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN (1991)** A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an sh2-like region. *Science* 254: 274-7.
- Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH (2006)** Tigar, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126: 107-20.
- Beretta L, Gingras AC, Svitkin YV, Hall MN, Sonenberg N (1996)** Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap- dependent initiation of translation. *EMBO J* 15: 658-64.
- Berlett BS, Stadtman ER (1997)** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272: 20313-6.
- Betsholtz C (2004)** Insight into the physiological functions of pdgf through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 215-28.
- Betsholtz C, Heldin CH, Nister M, Ek B, Wasteson A, Westermark B (1983)** Synthesis of a pdgf-like growth factor in human glioma and sarcoma cells suggests the expression of the cellular homologue to the transforming protein of simian sarcoma virus. *Biochem Biophys Res Commun* 117: 176-82.
- Bijur GN, Jope RS (2003)** Rapid accumulation of akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem* 87: 1427-35.
- Bopenhagen D, Clayton DA (1977)** Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* 11: 719-27.
- Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Bonnet S, Harry G, Hashimoto K, Porter CJ, Andrade MA, Thebaud B, Michelakis ED (2007)** A mitochondria-k⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11: 37-51.
- Boveris A, Chance B (1973)** The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134: 707-16.
- Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K (1988)** Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 7972-6.
- Boyer PD (1997)** The ATP synthase. A splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66: 717-49.
- Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J (2005)** The hypoxia-inducible factor and tumor progression along the angiogenic pathway. *Int Rev Cytol* 242: 157-213.
- Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N (2004)** Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and

- activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med.* 37: 755-67.
- Brandon M, Baldi P, Wallace DC (2006)** Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 25: 4647-62.
- Breen GA (1988)** Bovine liver cDNA clones encoding a precursor of the alpha-subunit of the mitochondrial ATP synthase complex. *Biochem Biophys Res Commun* 152: 264-69.
- Breslow A (1970)** Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172: 902-8.
- Brightwell G, Poirier V, Cole E, Ivins S, Brown KW (1997)** Serum-dependent and cell cycle-dependent expression from a cytomegalovirus-based mammalian expression vector. *Gene* 194: 115-23.
- Broekemeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR (1989)** Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Biol Chem* 264: 7826-30.
- Bui T, Thompson CB (2006)** Cancer's sweet tooth. *Cancer Cell* 9: 419-20.
- Burwick NR, Wahl ML, Fang J, Zhong Z, Moser TL, Li B, Capaldi RA, Kenan DJ, Pizzo SV (2005)** An inhibitor of the f1 subunit of atp synthase (if1) modulates the activity of angiostatin on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 280: 1740-5.
- Bustamante E, Morris HP, Pedersen PL (1981)** Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. *J Biol Chem* 256: 8699-704.
- Cantatore P, Polosa PL, Fracasso F, Flagella Z, Gadaleta MN (1986)** Quantitation of mitochondrial RNA species during rat liver development: the concentration of cytochrome oxidase subunit I (CoI) mRNA increases at birth. *Cell Differ* 19: 125-32.
- Canter JA, Kallianpur AR, Parl FF, Millikan RC (2005)** Mitochondrial dna g10398a polymorphism and invasive breast cancer in african-american women. *Cancer Res* 65: 8028-33.
- Capaldi RA, Aggeler R (2002)** Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem Sci* 27: 154-60.
- Carew JS, Huang P (2002)** Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 1: 9.
- Carr KM, Bittner M, Trent JM (2003)** Gene-expression profiling in human cutaneous melanoma. *Oncogene* 22: 3076-80.
- Cavalli LR, Varella Garcia M, Liang BC (1997)** Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA. *Cell Growth Differ* 8: 1189-98.
- Chae HJ, Kang JS, Byun JO, Han KS, Kim DU, Oh SM, Kim HM, Chae SW,**

-
- Kim HR (2000)** Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol Res* 42: 373-81.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S (2000)** Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29: 323-33.
- Chatterjee A, Mambo E, Sidransky D (2006)** Mitochondrial dna mutations in human cancer. *Oncogene* 25: 4663-74.
- Chen H, Chan DC (2005)** Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet* 14: R283-9.
- Chen Z, Odstreil EA, Tu BP, McKnight SL (2007)** Restriction of DNA replication to the reductive phase of the metabolic cycle protects genome integrity. *Science* 316: 1916-9.
- Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC, Tsichlis PN, Testa JR (1992)** Akt2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9267-71.
- Chi SL, Pizzo SV (2006)** Cell surface flf0 atp synthase: a new paradigm? *Ann Med* 38: 429-38.
- Chi SL, Wahl ML, Mowery YM, Shan S, Mukhopadhyay S, Hilderbrand SC, Kenan DJ, Lipes BD, Johnson CE, Marusich MF, Capaldi RA, Dewhirst MW, Pizzo SV (2007)** Angiostatin-like activity of a monoclonal antibody to the catalytic subunit of flf0 atp synthase. *Cancer Res* 67: 4716-24.
- Chin L (2003)** The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer* 3: 559-70.
- Chipuk JE, Green DR (2005)** Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 268-75.
- Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC (1989)** Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 81: 1893-904.
- Clayton DA (1982)** Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28: 693-705.
- Clayton DA, Vinograd J (1969)** Complex mitochondrial DNA in leukemic and normal human myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 62: 1077-84.
- Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, Shoji M, Sexton DG, Cotsonis G, Cerimele F, Govindarajan B, Macaron N, Arbiser JL (2002)** Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res* 8: 3728-33.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG (1992)** Overexpression of a transporter gene
-

- in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-4.
- Collins TJ, Bootman MD (2003)** Mitochondria are morphologically heterogeneous within cells. *J Exp Biol* 206: 1993-2000.
- Cornelis S, Bruynooghe Y, Denecker G, Van Huffel S, Tinton S, Beyaert R (2000)** Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5: 597-605.
- Coy JF, Dressler D, Wilde J, Schubert P (2005)** Mutations in the transketolase-like gene *tktl1*: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer. *Clin Lab* 51: 257-73.
- Creancier L, Morello D, Mercier P, Prats AC (2000)** Fibroblast growth factor 2 internal ribosome entry site (IRES) activity ex vivo and in transgenic mice reveals a stringent tissue-specific regulation. *J Cell Biol* 150: 275-81.
- Cuezva JM, Chen G, Alonso AM, Isidoro A, Misek DE, Hanash SM, Beer DG (2004)** The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis* 25 (7): 1157-63.
- Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, Krajewski S, Santamaria G, Kim H, Zapata JM, Marusawa H, Chamorro M, Reed JC (2002)** The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 62: 6674-81.
- Cuezva JM, Ostronoff LK, Ricart J, López de Heredia M, Di Liegro CM, Izquierdo JM (1997)** Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J Bioenerg Biomembr* 29: 365-77.
- Cuezva JM, Sanchez-Arago M, Sala S, Blanco-Rivero A, Ortega AD (2007)** A message emerging from development: the repression of mitochondrial beta-f1-atpase expression in cancer. *J Bioenerg Biomembr* 39: 259-65.
- Dang CV, Semenza GL (1999)** Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 24: 68-72.
- Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang CY, Krauss S, Ranger AM, Datta SR, Greenberg ME, Licklider LJ, Lowell BB, Gygi SP, Korsmeyer SJ (2003)** BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424: 952-6.
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F (1992)** Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13: 795-808.
- Das B, Mondragon MO, Sadeghian M, Hatcher VB, Norin AJ (1994)** A novel ligand in lymphocyte-mediated cytotoxicity: expression of the beta subunit of h⁺ transporting atp synthase on the surface of tumor cell lines. *J Exp Med* 180: 273-81.
- Davis AF, Clayton DA (1996)** In situ localization of mitochondrial DNA replication in

- intact mammalian cells. *J Cell Biol* 135: 883-93.
- De Milito A, Iessi E, Logozzi M, Lozupone F, Spada M, Marino ML, Federici C, Perdicchio M, Matarrese P, Lugini L, Nilsson A, Fais S (2007)** Proton pump inhibitors induce apoptosis of human b-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species. *Cancer Res* 67: 5408-17.
- Detmer SA, Chan DC (2007)** Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 870-9.
- Deveraux QL, Stennicke HR, Salvesen GS, Reed JC (1999)** Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol* 19: 388-98.
- Dewey WC, Fuhr MA (1976)** Quantification of mitochondria during the cell cycle of chinese hamster cells. *Exp Cell Res* 99: 23-30.
- Dey R, Moraes CT (2000)** Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate the protective effect of Bcl-x(L) in osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 275: 7087-94.
- Di Liegro CM, Bellafiore M, Izquierdo JM, Rantanen A, Cuezva JM (2000)** 3'-Untranslated regions of oxidative phosphorylation mRNAs function in vivo as enhancers of translation. *Biochem J* 352: 109-15.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000)** Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42.
- Ebner E, Schatz G (1973)** Mitochondrial assembly in respiration-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. 3. A nuclear mutant lacking mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 248: 5379-84.
- Egea G, Izquierdo JM, Ricart J, San Martín C, Cuezva JM (1997)** mRNA encoding the beta-subunit of the mitochondrial F1-ATPase complex is a localized mRNA in rat hepatocytes. *Biochem J* 322: 557-65.
- Ellerby HM, Arap W, Ellerby LM, Kain R, Andrusiak R, Rio GD, Krajewski S, Lombardo CR, Rao R, Ruoslahti E, Bredesen DE, Pasqualini R (1999)** Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* 5: 1032-8.
- Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB (2004)** Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 64: 3892-9.
- Faccio L, Fusco C, Chen A, Martinotti S, Bonventre JV, Zervos AS (2000)** Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J Biol Chem* 275: 2581-8.
- Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J (2003)** Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* 88: 41-56.

- Ferri KF, Kroemer G (2001)** Mitochondria--the suicide organelles. *Bioessays* 23: 111-5.
- Fischer CP, Bode BP, Hurley BP, Souba WW (1997)** Alterations in oxidative metabolism and glutamine transport support glucose production in the tumor-influenced hepatocyte. *J Surg Res* 69: 379-84.
- Flier JS, Mueckler MM, Usher P, Lodish HF (1987)** Elevated levels of glucose transport and transporter messenger rna are induced by ras or src oncogenes. *Science* 235: 1492-5.
- Flores AI, Cuezva JM (1997)** Identification of sequence similarity between 60 kDa and 70 kDa molecular chaperones: evidence for a common evolutionary background? *Biochem J* 322 (Pt 2): 641-7.
- Fontenay M, Cathelin S, Amiot M, Gyan E, Solary E (2006)** Mitochondria in hematopoiesis and hematological diseases. *Oncogene* 25: 4757-67.
- Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ (2001)** The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1: 515-25.
- Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton MR (2004)** A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 4: 177-83.
- Galluzzi L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G (2006)** Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene* 25: 4812-30.
- Garber K (2004)** Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer. *J Natl Cancer Inst* 96: 1805-6.
- Garber K (2006)** Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science* 312: 1158-9.
- Garesse R, Vallejo CG (2001)** Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263: 1-16.
- Gatenby RA, Gillies RJ (2004)** Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4: 891-9.
- Geschwind JF, Georgiades CS, Ko YH, Pedersen PL (2004)** Recently elucidated energy catabolism pathways provide opportunities for novel treatments in hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 4: 449-57.
- Geschwind JF, Ko YH, Torbenson MS, Magee C, Pedersen PL (2002)** Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production. *Cancer Res* 62: 3909-13.
- Goldstein JC, Munoz-Pinedo C, Ricci JE, Adams SR, Kelekar A, Schuler M, Tsien RY, Green DR (2005)** Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. *Cell Death Differ* 12: 453-62.

- Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K (2004)** Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract* 58: 1134-41.
- Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W (2000)** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21: 1037-53.
- Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N (2001)** Inhibition of early apoptotic events by akt/pkb is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev* 15: 1406-18.
- Gottschalk S, Anderson N, Hainz C, Eckhardt SG, Serkova NJ (2004)** Imatinib (sti571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia bcr-abl-positive cells. *Clin Cancer Res* 10: 6661-8.
- Govindarajan B, Shah A, Cohen C, Arnold RS, Schechner J, Chung J, Mercurio AM, Alani R, Ryu B, Fan CY, Cuezva JM, Martinez M, Arbiser JL (2005)** Malignant transformation of human cells by constitutive expression of platelet-derived growth factor-bb. *J Biol Chem* 280: 13936-43.
- Govindarajan B, Sligh JE, Vincent BJ, Li M, Canter JA, Nickoloff BJ, Rodenburg RJ, Smeitink JA, Oberley L, Zhang Y, Slingerland J, Arnold RS, Lambeth JD, Cohen C, Hilenski L, Griendling K, Martinez-Diez M, Cuezva JM, Arbiser JL (2007)** Overexpression of akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. *J Clin Invest* 117: 719-29.
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ (1996)** Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours [see comments]. *Nature* 379: 88-91.
- Green D, Kroemer G (1998)** The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 8: 267-71.
- Green DR, Kroemer G (2004)** The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626-9.
- Green DR, Reed JC (1998)** Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-12.
- Gross A, Pilcher K, Blachly-Dyson E, Basso E, Jockel J, Bassik MC, Korsmeyer SJ, Forte M (2000)** Biochemical and genetic analysis of the mitochondrial response of yeast to BAX and BCL-X(L). *Mol Cell Biol* 20: 3125-36.
- Grossman LI, Shoubridge EA (1996)** Mitochondrial genetics and human disease. *Bioessays* 18: 983-91.
- Habano W, Sugai T, Nakamura S, Uesugi N, Higuchi T, Terashima M, Horiuchi S (2003)** Reduced expression and loss of heterozygosity of the SDHD gene in colorectal and gastric cancer. *Oncol Rep* 10: 1375-80.
- Hackenbrock CR (1966)** Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in

- metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol* 30: 269-97.
- Han D, Williams E, Cadenas E (2001a)** Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 353: 411-6.
- Han Z, Pantazis P, Wyche JH, Kouttab N, Kidd VJ, Hendrickson EA (2001b)** A fas-associated death domain protein-dependent mechanism mediates the apoptotic action of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the human leukemic jurkat cell line. *J Biol Chem* 276: 38748-54.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000)** The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Harris MH, Vander Heiden MG, Kron SJ, Thompson CB (2000)** Role of oxidative phosphorylation in Bax toxicity. *Mol Cell Biol* 20: 3590-6.
- He QY, Chen J, Kung HF, Yuen AP, Chiu JF (2004)** Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. *Proteomics* 4: 271-8.
- Hellen CU, Sarnow P (2001)** Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 15: 1593-612.
- Hervouet E, Demont J, Pecina P, Vojtiskova A, Houstek J, Simonnet H, Godinot C (2005)** A new role for the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: stimulation of mitochondrial oxidative phosphorylation complex biogenesis. *Carcinogenesis* 26: 531-9.
- Herzig RP, Scacco S, Scarpulla RC (2000)** Sequential serum-dependent activation of creb and nrf-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J Biol Chem* 275: 13134-41.
- Hoberman HD (1975)** Is there a role for mitochondrial genes in carcinogenesis? *Cancer Res* 35: 3332-5.
- Hommes FA (1975)** Energetic aspects of late fetal and neonatal metabolism. En: *Normal and pathological development of energy metabolism*. Págs.: 1-9. (Hommes FA, van der Berg CJ, eds.). Academia Press Inc., London.
- Hood DA (2001)** Invited review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90: 1137-57.
- Hoon DS, Bostick P, Kuo C, Okamoto T, Wang HJ, Elashoff R, Morton DL (2000)** Molecular markers in blood as surrogate prognostic indicators of melanoma recurrence. *Cancer Res* 60: 2253-7.
- Horton TM, Petros JA, Heddi A, Shoffner J, Kaufman AE, Graham SDJ, Gramlich T, Wallace DC (1996)** Novel mitochondrial DNA deletion found in a renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 15: 95-101.
- Isidoro A, Casado E, Redondo A, Acebo P, Espinosa E, Alonso AM, Cejas P,**

-
- Hardisson D, Fresno Vara JA, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M, Cuezva JM (2005)** Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 26 (12): 2095-104.
- Isidoro A, Martinez M, Fernandez PL, Ortega AD, Santamaria G, Chamorro M, Reed JC, Cuezva JM (2004)** Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J* 378: 17-20.
- Izquierdo JM (2006)** Control of the ATP synthase beta subunit expression by RNA-binding proteins TIA-1, TIAR, and HuR. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 703-11.
- Izquierdo JM, Cuezva JM (1997)** Control of the translational efficiency of beta-F1-ATPase mRNA depends on the regulation of a protein that binds the 3' untranslated region of the mRNA. *Mol Cell Biol* 17: 5255-68.
- Izquierdo JM, Cuezva JM (2000)** Internal-ribosome-entry-site functional activity of the 3'-untranslated region of the mRNA for the beta subunit of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Biochem J* 346: 849-55.
- Izquierdo JM, Cuezva JM (2005)** Epigenetic regulation of the binding activity of translation inhibitory proteins that bind the 3' untranslated region of beta-F1-ATPase mRNA by adenine nucleotides and the redox state. *Arch Biochem Biophys* 433: 481-6.
- Izquierdo JM, Ricart J, Ostronoff LK, Egea G, Cuezva JM (1995)** Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of beta-F1-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. *J Biol Chem* 270: 10342-50.
- Jaattela M (2004)** Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 23: 2746-56.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997)** Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347-54.
- Jagasia R, Grote P, Westermann B, Conradt B (2005)** DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature* 433: 754-60.
- Jiang F, Ryan MT, Schlame M, Zhao M, Gu Z, Klingenberg M, Pfanner N, Greenberg ML (2000)** Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem* 275: 22387-94.
- John GB, Shang Y, Li L, Renken C, Mannella CA, Selker JM, Rangell L, Bennett MJ, Zha J (2005)** The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell* 16: 1543-54.
- Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB (2005)** AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic
-

checkpoint. *Mol Cell* 18: 283-93.

Joshi B, Li L, Taffe BG, Zhu Z, Wahl S, Tian H, Ben-Josef E, Taylor JD, Porter AT, Tang DG (1999) Apoptosis induction by a novel anti-prostate cancer compound, BMD188 (a fatty acid-containing hydroxamic acid), requires the mitochondrial respiratory chain. *Cancer Res* 59: 4343-55.

Ka H, Park HJ, Jung HJ, Choi JW, Cho KS, Ha J, Lee KT (2003) Cinnamaldehyde induces apoptosis by ros-mediated mitochondrial permeability transition in human promyelocytic leukemia hl-60 cells. *Cancer Lett* 196: 143-52.

Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Droge W, Schmitz ML (2000) The pro- or anti-apoptotic function of nf-kappab is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem* 267: 3828-35.

Karbowski M, Norris KL, Cleland MM, Jeong SY, Youle RJ (2006) Role of bax and bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 443: 658-62.

Karbowski M, Youle RJ (2003) Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 10: 870-80.

Karrasch S, Walker JE (1999) Novel features in the structure of bovine ATP synthase. *J Mol Biol* 290: 379-84.

Kasibhatla S, Tseng B (2003) Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol Cancer Ther* 2: 573-80.

Kastan MB, Bartek J (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432: 316-23.

Kelly DP, Scarpulla RC (2004) Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* 18 (4): 357-68.

Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73: 2013-26.

Kim H, You S, Kim IJ, Farris J, Foster LK, Foster DN (2001) Increased mitochondrial-encoded gene transcription in immortal df-1 cells. *Exp Cell Res* 265: 339-47.

Kim IA, Bae SS, Fernandes A, Wu J, Muschel RJ, McKenna WG, Birnbaum MJ, Bernhard EJ (2005) Selective inhibition of ras, phosphoinositide 3 kinase, and akt isoforms increases the radiosensitivity of human carcinoma cell lines. *Cancer Res* 65: 7902-10.

Kim JW, Dang CV (2005) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci* 30: 142-50.

Kim JW, Dang CV (2006) Cancer's molecular sweet tooth and the warburg effect. *Cancer Res* 66: 8927-30.

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV (2006) Hif-1-mediated expression

of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3: 177-85.

Kim JY, Kim YH, Chang I, Kim S, Pak YK, Oh BH, Yagita H, Jung YK, Oh YJ, Lee MS (2002) Resistance of mitochondrial DNA-deficient cells to TRAIL: role of Bax in TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene* 21: 3139-48.

Kindy MS, Brown KE, Sonenshein GE (1991) Regulation of expression of the growth-state-related genes 2F1 and 2A9 during entry of quiescent smooth muscle cells into the cell cycle. *J Cell Biochem* 46: 345-50.

Klaunig JE, Kamendulis LM (2004) The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 239-67.

Klevecz RR, Bolen J, Forrest G, Murray DB (2004) A genomewide oscillation in transcription gates dna replication and cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1200-5.

Ko YH, Pedersen PL, Geschwind JF (2001) Glucose catabolism in the rabbit vx2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. *Cancer Lett* 173: 83-91.

Ko YH, Smith BL, Wang Y, Pomper MG, Rini DA, Torbenson MS, Hullihen J, Pedersen PL (2004) Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 269-75.

Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416: 15-8.

Krebs, H (1981) En: *Otto Warburg: Cell Physiologist, Biochemist, and Eccentric*. Oxford University Press, USA.

Kroemer G, Martin SJ (2005) Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11: 725-30.

Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Prolla TA (2005) Mitochondrial dna mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309: 481-4.

Kuwana T, Newmeyer DD (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 15: 691-9.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.

Lal A, Lash AE, Altschul SF, Velculescu V, Zhang L, McLendon RE, Marra MA, Prange C, Morin PJ, Polyak K, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Strausberg RL, Riggins GJ (1999) A public database for gene expression in

- human cancers. *Cancer Res* 21: 5403-7.
- Lambert AJ, Brand MD (2004)** Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J* 382: 511-7.
- Lawlor MA, Alessi DR (2001)** Pkb/akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 114: 2903-10.
- Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright JJr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM (1996)** Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9782-7.
- Lee SS, Lee RY, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Ruvkun G (2003)** A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nat Genet* 33: 40-8.
- Lefebvre-Legendre L, Balguerie A, Duvezin-Caubet S, Giraud MF, Slonimski PP, Di Rago JP (2003)** F1-catalysed atp hydrolysis is required for mitochondrial biogenesis in *saccharomyces cerevisiae* growing under conditions where it cannot respire. *Mol Microbiol* 47: 1329-39.
- Lefebvre-Legendre L, Salin B, Schaeffer J, Brethes D, Dautant A, Ackerman SH, di Rago JP (2005)** Failure to assemble the alpha 3 beta 3 subcomplex of the atp synthase leads to accumulation of the alpha and beta subunits within inclusion bodies and the loss of mitochondrial cristae in *saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280: 18386-92.
- Legros F, Malka F, Frachon P, Lombes A, Rojo M (2004)** Organization and dynamics of human mitochondrial dna. *J Cell Sci* 117: 2653-62.
- Lehtonen R, Kiuru M, Vanharanta S, Sjoberg J, Aaltonen LM, Aittomaki K, Arola J, Butzow R, Eng C, Husgafvel-Pursiainen K, Isola J, Jarvinen H, Koivisto P, Mecklin JP, Peltomaki P, Salovaara R, Wasenius VM, Karhu A, Launonen V, Nupponen NN, Aaltonen LA (2004)** Biallelic inactivation of fumarate hydratase (fh) occurs in nonsyndromic uterine leiomyomas but is rare in other tumors. *Am J Pathol* 164: 17-22.
- Leist M, Jaattela M (2001)** Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 589-98.
- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P (1997)** Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185: 1481-6.
- Leprat P, Ratinaud MH, Maftah A, Petit JM, Julien R (1990)** Use of nonyl acridine orange and rhodamine 123 to follow biosynthesis and functional assembly of mitochondrial membrane during L1210 cell cycle. *Exp Cell Res* 186: 130-137.
- Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wonsey DR, O'Donnell KA, Kim JW, Yustein JT,**

-
- Lee LA, Dang CV (2005)** Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol* 25: 6225-34.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998)** Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501.
- Li LY, Luo X, Wang X (2001)** Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95-9.
- Li P, Nijhawan D, Wang X (2004)** Mitochondrial activation of apoptosis. *Cell* 116: S57-9, 2 p following S59.
- Liotta LA, Kohn EC (2003)** Cancer's deadly signature. *Nat Genet* 33: 10-1.
- Lithgow T, Cuezva JM, Silver PA (1997)** Highways for protein delivery to the mitochondria. *Trends Biochem Sci* 22: 110-113.
- Liu ET (2003)** Classification of cancers by expression profiling. *Curr Opin Genet Dev* 13: 97-103.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996)** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-57.
- Liu Y, Fiskum G, Schubert D (2002)** Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80: 780-7.
- López de Heredia M, Izquierdo JM, Cuezva JM (2000)** A conserved mechanism for controlling the translation of beta-F1-ATPase mRNA between the fetal liver and cancer cells. *J Biol Chem* 275: 7430-7437.
- Lopez-Rios F, Sanchez-Arago M, Garcia-Garcia E, Ortega AD, Berrendero JR, Pozo-Rodriguez F, Lopez-Encuentra A, Ballestin C, Cuezva JM (2007)** Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res* 67: 9013-7.
- Lowell BB, Spiegelman BM (2000)** Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404: 652-60.
- Luciakova K, Li R, Nelson BD (1992)** Differential regulation of the transcript levels of some nuclear- encoded and mitochondrial-encoded respiratory-chain components in response to growth activation. *Eur J Biochem* 207: 253-57.
- Luis AM, Izquierdo JM, Ostronoff LK, Salinas M, Santarén JF, Cuezva JM (1993)** Translational regulation of mitochondrial differentiation in neonatal rat liver. Specific increase in the translational efficiency of the nuclear-encoded mitochondrial beta-F1-ATPase mRNA. *J Biol Chem* 268: 1868-75.
- Lunardi J, Attardi G (1991)** Differential regulation of expression of the multiple ADP/ATP translocase genes in human cells. *J Biol Chem* 266: 16534-40.
- Lutter R, Saraste M, van Walraven HS, Runswick MJ, Finel M, Deatherage**
-

- JF, Walker JE (1993)** F1F0-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase. *Biochem J* 295: 799-806.
- Ma W, Sung HJ, Park JY, Matoba S, Hwang PM (2007)** A pivotal role for p53: balancing aerobic respiration and glycolysis. *J Bioenerg Biomembr* 39 (3): 243-6.
- Mack FA, Rathmell WK, Arsham AM, Gnarr J, Keith B, Simon MC (2003)** Loss of pvh1 is sufficient to cause hif dysregulation in primary cells but does not promote tumor growth. *Cancer Cell* 3: 75-88.
- Magnusson J, Orth M, Lestienne P, Taanman JW (2003)** Replication of mitochondrial dna occurs throughout the mitochondria of cultured human cells. *Exp Cell Res* 289: 133-42.
- Maher JC, Krishan A, Lampidis TJ (2004)** Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-d-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother Pharmacol* 53: 116-22.
- Mandal S, Guptan P, Owusu-Ansah E, Banerjee U (2005)** Mitochondrial regulation of cell cycle progression during development as revealed by the tenured mutation in drosophila. *Dev Cell* 9: 843-54.
- Margeot A, Blugeon C, Sylvestre J, Vialette S, Jacq C, Corral-Debrinski M (2002)** In *Saccharomyces cerevisiae*, ATP2 mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function. *EMBO J* 21: 6893-904.
- Margineantu DH, Gregory Cox W, Sundell L, Sherwood SW, Beechem JM, Capaldi RA (2002)** Cell cycle dependent morphology changes and associated mitochondrial dna redistribution in mitochondria of human cell lines. *Mitochondrion* 1: 425-35.
- Martinez-Diez M, Santamaria G, Ortega AD, Cuezva JM (2006)** Biogenesis and dynamics of mitochondria during the cell cycle: significance of 3'utrs. *PLoS ONE* 1: e107.
- Martinez LO, Jacquet S, Esteve JP, Rolland C, Cabezon E, Champagne E, Pineau T, Georgeaud V, Walker JE, Terce F, Collet X, Perret B, Barbaras R (2003)** Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 421: 75-9.
- Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J (2005)** Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22: 355-70.
- Maschek G, Savaraj N, Priebe W, Braunschweiger P, Hamilton K, Tidmarsh GF, De Young LR, Lampidis TJ (2004)** 2-deoxy-d-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res* 64: 31-4.
- Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL (2006)** Hexokinase ii: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to

- mitochondria. *Oncogene* 25: 4777-86.
- Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL (2001)** Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type ii hexokinase gene to hypoxic conditions. *J Biol Chem* 276: 43407-12.
- Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC (2000)** Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2: 318-25.
- Matsuyama S, Xu Q, Velours J, Reed JC (1998)** The Mitochondrial F0F1-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell* 1: 327-36.
- Mazurek S, Boschek CB, Eigenbrodt E (1997)** The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy. *J Bioenerg Biomembr* 29: 315-30.
- Meierhofer D, Mayr JA, Foetschl U, Berger A, Fink K, Schmeller N, Hacker GW, Hauser-Kronberger C, Kofler B, Sperl W (2004)** Decrease of mitochondrial DNA content and energy metabolism in renal cell carcinomas. *Carcinogenesis* 25: 1005-10.
- Melnik VI, Bikbulatova LS, Gulyaeva NV, Bazyan AS (2001)** Synaptic vesicle acidification and exocytosis studied with acridine orange fluorescence in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res* 26: 549-54.
- Michaud GA, Salcius M, Zhou F, Bangham R, Bonin J, Guo H, Snyder M, Predki PF, Schweitzer BI (2003)** Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays. *Nat Biotechnol* 21: 1509-12.
- Minauro-Sanmiguel F, Wilkens S, Garcia JJ (2005)** Structure of dimeric mitochondrial atp synthase: novel f0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12356-8.
- Miwa S, Brand MD (2003)** Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. *Biochem Soc Trans* 31: 1300-1.
- Modica-Napolitano JS, Koya K, Weisberg E, Brunelli BT, Li Y, Chen LB (1996)** Selective damage to carcinoma mitochondria by the rhodacyanine mkt-077. *Cancer Res* 56: 544-50.
- Modica-Napolitano JS, Singh K (2002)** Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer. *Expert Rev Mol Med* 4 (9): 1-19.
- Modica-Napolitano JS, Singh KK (2004)** Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion* 4: 755-62.
- Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, Hjerrild M, Wisniewski JR, Stahl E, Bolouri MS, Ray HN, Sihag S, Kamal M, Patterson N, Lander ES, Mann M (2003)** Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in

mouse mitochondria. *Cell* 115: 629-40.

Morais R, Zinkewich-Peotti K, Parent M, Wang H, Babai F, Zollinger M (1994) Tumor-forming ability in athymic nude mice of human cell lines devoid of mitochondrial dna. *Cancer Res* 54 (14):3889-96.

Moser TL, Kenan DJ, Ashley TA, Roy JA, Goodman MD, Misra UK, Cheek DJ, Pizzo SV (2001) Endothelial cell surface fl-f0 atp synthase is active in atp synthesis and is inhibited by angiostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6656-61.

Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV (1999) Angiostatin binds atp synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2811-6.

Murray AW, Kirschner MW (1989) Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science* 246: 614-21.

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996) Flice, a novel fadd-homologous ice/ced-3-like protease, is recruited to the cd95 (fas/apo-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85: 817-27.

Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, Sakaue H, Liu W, Weigel RJ, Roth RA (1999) Up-regulation of akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem* 274: 21528-32.

Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14681-6.

Neckelmann N, Li K, Wade RP, Shuster R, Wallace DC (1987) cDNA sequence of a human skeletal muscle ADP/ATP translocator: lack of a leader peptide, divergence from a fibroblast translocator cDNA, and coevolution with mitochondrial DNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7580-4.

Neckelmann N, Warner CK, Chung A, Kudoh J, Minoshima S, Fukuyama R, Maekawa M, Shimizu Y, Shimizu N, Liu JD, al. e (1989) The human ATP synthase beta subunit gene: sequence analysis, chromosome assignment, and differential expression. *Genomics* 5: 829-43.

Neumann HP, Pawlu C, Peczkowska M, Bausch B, McWhinney SR, Muresan M, Buchta M, Franke G, Klisch J, Bley TA, Hoegerle S, Boedeker CC, Opocher G, Schipper J, Januszewicz A, Eng C (2004) Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA* 292: 943-51.

Newmeyer DD, Ferguson-Miller S (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112: 481-90.

Nicholls D, Bernardi P, Brand M, Halestrap A, Lemasters J, Reynolds I (2000)

- Apoptosis and the laws of thermodynamics. *Nat Cell Biol* 2: E172-3.
- Nicholls DG, Ward MW (2000)** Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci* 23: 166-74.
- Niemann S, Muller U (2000)** Mutations in *sdhc* cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet* 26: 268-70.
- Nishida K, Yagisawa F, Kuroiwa H, Nagata T, Kuroiwa T (2005)** Cell cycle-regulated, microtubule-independent organelle division in cyanidioschyzon merolae. *Mol Biol Cell* 16: 2493-502.
- Nohl H, Kozlov AV, Gille L, Staniek K (2003)** Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. *Biochem Soc Trans* 31: 1308-11.
- Nulton-Persson AC, Szweda LI (2001)** Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 276: 23357-61.
- O'Gorman DM, Cotter TG (2001)** Molecular signals in anti-apoptotic survival pathways. *Leukemia* 15: 21-34.
- Ockner RK, Kaikaus RM, Bass NM (1993)** Fatty-acid metabolism and the pathogenesis of hepatocellular carcinoma: review and hypothesis. *Hepatology* 18: 669-76.
- Ohta S (2006)** Contribution of somatic mutations in the mitochondrial genome to the development of cancer and tolerance against anticancer drugs. *Oncogene* 25: 4768-76.
- Okamoto K, Shaw JM (2005)** Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 39: 503-36.
- Okorokov AL (2003)** P53 in a crosstalk between dna repair and cell cycle checkpoints. *Cell Cycle* 2: 233-5.
- Orrenius S, Nobel CS, van den Dobbelssteen DJ, Burkitt MJ, Slater AF (1996)** Dithiocarbamates and the redox regulation of cell death. *Biochem Soc Trans* 24: 1032-8.
- Ortega AD, Cuezva JM (2004)** The organelles I: Mitochondrial failure and neurodegeneration. En: *Brain Damage and Repair*. Págs.: 95-110. (Herdengen T, Delgado-García JM, eds.). Kluwer Academic Publisher, The Netherlands.
- Ortega AD, Sala S, Gonzalez-Baron M, Cuezva JM** HuR and the bioenergetic signature of breast cancer: a low tumor expression of the RNA binding protein predicts a higher risk of disease recurrence. (En revisión).
- Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV (2000)** Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* 275: 21797-800.
- Ostman A (2004)** Pdgf receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of

tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 275-86.

Ostrander DB, Zhang M, Mileykovskaya E, Rho M, Dowhan W (2001) Lack of mitochondrial anionic phospholipids causes an inhibition of translation of protein components of the electron transport chain. A yeast genetic model system for the study of anionic phospholipid function in mitochondria. *J Biol Chem* 276: 25262-72.

Ostronoff LK, Izquierdo JM, Enríquez JA, Montoya J, Cuezva JM (1996) Transient activation of mitochondrial translation regulates the expression of the mitochondrial genome during mammalian mitochondrial differentiation. *Biochem J* 316: 183-91.

Pagano A, Donati Y, Metrailler I, Barazzone Argiroffo C (2004) Mitochondrial cytochrome c release is a key event in hyperoxia-induced lung injury: protection by cyclosporin A. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L275-83.

Pan JG, Mak TW (2007) Metabolic targeting as an anticancer strategy: dawn of a new era? *Sci STKE* 2007: pe14.

Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC (2006) Hif-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 3: 187-97.

Park SY, Chang I, Kim JY, Kang SW, Park SH, Singh K, Lee MS (2004) Resistance of mitochondrial DNA-depleted cells against cell death: role of mitochondrial superoxide dismutase. *J Biol Chem* 279 : 7512-20.

Parrella P, Xiao Y, Fliss M, Sanchez-Cespedes M, Mazzei P, Rinaldi M, Nicol T, Gabrielson E, Cuomo C, Cohen D, Pandit S, Spencer M, Rabitti C, Fazio VM, Sidransky D (2001) Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates. *Cancer Res* 61: 7623-6.

Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B, Modrich P (1993) Hypermutability and mismatch repair deficiency in rer+ tumor cells. *Cell* 75: 1227-36.

Paumard P, Vaillier J, Couлары B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brethes D, di Rago JP, Velours J (2002) The atp synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* 21: 221-30.

Pedersen PL, Mathupala S, Rempel A, Geschwind JF, Ko YH (2002) Mitochondrial bound type ii hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochim Biophys Acta* 1555 (1-3): 14-20.

Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P (2006) Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25: 4633-46.

Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, Copeland WC (2001) Mitochondrial dna in human malignancy. *Mutat Res* 488: 119-33.

- Perfettini JL, Roumier T, Kroemer G (2005)** Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol* 15: 179-83.
- Petit PX, Goubern M, Diolet P, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G (1998)** Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition. *FEBS Lett* 426: 111-6.
- Petricoin EF, Zoon KC, Kohn EC, Barrett JC, Liotta LA (2002)** Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nat Rev Drug Discov* 1: 683-95.
- Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, Lim S, Issa MM, Flanders WD, Hosseini SH, Marshall FF, Wallace DC (2005)** mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 719-24.
- Plas DR, Thompson CB (2002)** Cell metabolism in the regulation of programmed cell death. *Trends Endocrinol Metab* 13: 75-8.
- Posakony JW, England JM, Attardi G (1977)** Mitochondrial growth and division during the cell cycle in HeLa cells. *J Cell Biol* 74: 468-91.
- Pospisilik JA, Knauf C, Joza N, Benit P, Orthofer M, Cani PD, Ebersberger I, Nakashima T, Sarao R, Neely G, Esterbauer H, Kozlov A, Kahn CR, Kroemer G, Rustin P, Burcelin R, Penninger JM (2007)** Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes. *Cell* 131: 476-91.
- Pyronnet S, Pradayrol L, Sonenberg N (2000)** A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5: 607-16.
- Pyronnet S, Sonenberg N (2001)** Cell-cycle-dependent translational control. *Curr Opin Genet Dev* 11 (1):13-8.
- Qin X, Sarnow P (2004)** Preferential translation of internal ribosome entry site-containing mrnas during the mitotic cycle in mammalian cells. *J Biol Chem* 279: 13721-8.
- Radsak K, Schutz E (1978)** Changes of mitochondrial dna polymerase-gamma activity in synchronized mouse cell cultures. *Eur J Biochem* 89: 3-9.
- Raha S, Robinson BH (2000)** Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* 25: 502-8.
- Rais B, Comin B, Puigjaner J, Brandes JL, Creppy E, Saboureau D, Ennamany R, Lee WN, Boros LG, Cascante M (1999)** Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a g1 phase cycle arrest in ehrlich's tumor cells through inhibition of the pentose cycle. *FEBS Lett* 456: 113-8.
- Ramaswamy S, Golub TR (2002)** DNA microarrays in clinical oncology. *J Clin Oncol* 20: 1932-41.

- Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR (2003)** A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33: 49-54.
- Rathmell JC, Fox CJ, Plas DR, Hammerman PS, Cinalli RM, Thompson CB (2003)** Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol Cell Biol* 23: 7315-28.
- Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G (2002)** Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 192: 131-7.
- Reed JC (1999)** Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol* 11: 68-75.
- Rego AC, Vesce S, Nicholls DG (2001)** The mechanism of mitochondrial membrane potential retention following release of cytochrome c in apoptotic GT1-7 neural cells. *Cell Death Differ* 8: 995-1003.
- Reinke H, Gatfield D (2006)** Genome-wide oscillation of transcription in yeast. *Trends Biochem Sci* 31: 189-91.
- Reyes A, Yang MY, Bowmaker M, Holt IJ (2005)** Bidirectional replication initiates at sites throughout the mitochondrial genome of birds. *J Biol Chem* 280: 3242-50.
- Reyes R, Izquierdo JM (2007)** The RNA-binding protein PTB exerts translational control on 3'-untranslated region of the mRNA for the ATP synthase beta-subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 1107-12.
- Ricart J, Egea G, Izquierdo JM, San Martín C, Cuezva JM (1997)** Subcellular structure containing mRNA for beta subunit of mitochondrial H⁺-ATP synthase in rat hepatocytes is translationally active. *Biochem J* 324: 635-43.
- Ricart J, Izquierdo JM, Di Liegro CM, Cuezva JM (2002)** The assembly of the ribonucleoprotein complex containing the mRNA of the β -subunit of the mitochondrial H⁺-ATP synthase requires the participation of two distal *cis*-acting elements and a complex set of cellular *trans*-acting proteins. *Biochem J* 365: 417-28.
- Ricci JE, Gottlieb RA, Green DR (2003)** Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol* 160: 65-75.
- Ricci JE, Munoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Bailly-Maitre B, Perkins GA, Yadava N, Scheffler IE, Ellisman MH, Green DR (2004)** Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 117: 773-86.
- Richard SM, Bailliet G, Paez GL, Bianchi MS, Peltomaki P, Bianchi NO (2000)** Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer. *Cancer Res* 60: 4231-7.
- Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P (1977)** Labeling deoxyribonucleic acid to

- high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113: 237-51.
- Rigo P, Paulus P, Kaschten BJ, Hustinx R, Bury T, Jerusalem G, Benoit T, Foidart-Willems J (1996)** Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose. *Eur J Nucl Med* 23: 1641-74.
- Robertson JD, Orrenius S (2000)** Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol* 30: 609-27.
- Robey RB, Hay N (2006)** Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and akt. *Oncogene* 25: 4683-96.
- Rohr HP, Wirz A, Henning LC, Riede UN, Bianchi L (1971)** Morphometric analysis of the rat liver cell in the perinatal period. *Lab Invest* 24: 128-39.
- Rojas JD, Sennoune SR, Maiti D, Bakunts K, Reuveni M, Sanka SC, Martinez GM, Seftor EA, Meininger CJ, Wu G, Wesson DE, Hendrix MJ, Martinez-Zaguilan R (2006)** Vacuolar-type h⁺-atpases at the plasma membrane regulate pH and cell migration in microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1147-57.
- Rojo G, Chamorro M, Salas ML, Vinuela E, Cuezva JM, Salas J (1998)** Migration of mitochondria to viral assembly sites in African swine fever virus-infected cells. *J Virol* 72: 7583-88.
- Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA (2004)** Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 64: 985-93.
- Ruderman NB, Kapeller R, White MF, Cantley LC (1990)** Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1411-5.
- Ruiz De Mena I, Lefai E, Garesse R, Kaguni LS (2000)** Regulation of mitochondrial single-stranded dna-binding protein gene expression links nuclear and mitochondrial dna replication in drosophila. *J Biol Chem* 275: 13628-36.
- Sakamaki T, Casimiro MC, Ju X, Quong AA, Katiyar S, Liu M, Jiao X, Li A, Zhang X, Lu Y, Wang C, Byers S, Nicholson R, Link T, Shemluck M, Yang J, Fricke ST, Novikoff PM, Papanikolaou A, Arnold A, Albanese C, Pestell R (2006)** Cyclin d1 determines mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biol* 26: 5449-69.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** En: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santamaria G, Martinez-Diez M, Fabregat I, Cuezva JM (2006)** Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial h⁺-atp synthase. *Carcinogenesis* 27: 925-35.
- Santaren JF, Alconada A, Cuezva JM (1993)** Examination of processing of the rat liver mitochondrial F1-ATPase beta subunit precursor protein by high-resolution 2D-

- gel electrophoresis. *J Biochem (Tokyo)* 113: 129-31.
- Sawyers CL, Druker B (1999)** Tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Cancer J Sci Am* 5: 63-9.
- Scalettar BA, Abney JR, Hackenbrock CR (1991)** Dynamics, structure, and function are coupled in the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 8057-61.
- Scarlett JL, Sheard PW, Hughes G, Ledgerwood EC, Ku HH, Murphy MP (2000)** Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine-induced apoptosis in jurkat cells. *FEBS Lett* 475: 267-72.
- Scarpulla RC (2002)** Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* 286: 81-9.
- Scarpulla RC (2006)** Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* 97: 673-83.
- Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC (1997)** Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5113-18.
- Schieke SM, Phillips D, McCoy JP Jr, Aponte AM, Shen RF, Balaban RS, Finkel T (2006)** The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J Biol Chem* 281: 27643-52.
- Schmidt C, Lepsverdize E, Chi SL, Das AM, Pizzo SV, Dityatev A, Schachner M (2007)** Amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide bind to ATP synthase and regulate its activity at the surface of neural cells. *Mol Psychiatry* (Volumen y páginas aún por determinar).
- Schulz TJ, Thierbach R, Voigt A, Drewes G, Mietzner B, Steinberg P, Pfeiffer AF, Ristow M (2006)** Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: otto warburg revisited. *J Biol Chem* 281: 977-81.
- Selvanayagam P, Rajaraman S (1996)** Detection of mitochondrial genome depletion by a novel cdna in renal cell carcinoma. *Lab Invest* 74: 592-9.
- Semenza GL (2003)** Targeting hif-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721-32.
- Semenza GL, Artemov D, Bedi A, Bhujwalla Z, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Ravi R, Simons J, Taghavi P, Zhong H (2001)** 'the Metabolism of tumours': 70 years later. *Novartis Found Symp* 240: 251-60; discusión 260-4.
- Senoune SR, Bakunts K, Martinez GM, Chua-Tuan JL, Kebir Y, Attaya MN, Martinez-Zaguilan R (2004)** Vacuolar h⁺-atpase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1443-52.
- Sergeant N, Wattez A, Galvan-valencia M, Ghestem A, David JP, Lemoine J, Sautiere PE, Dachary J, Mazat JP, Michalski JC, Velours J, Mena-Lopez R,**

-
- Delacourte A (2003)** Association of ATP synthase alpha-chain with neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 117: 293-303.
- Shatkin AJ (1976)** Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* 9: 645-53.
- Shaw RJ (2006)** Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 18: 598-608.
- Shaw RJ, Cantley LC (2006)** Ras, pi(3)k and mtor signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441: 424-30.
- Shchepina LA, Pletjushkina OY, Avetisyan AV, Bakeeva LE, Fetisova EK, Izyumov DS, Saprunova VB, Vyssokikh MY, Chernyak BV, Skulachev VP (2002)** Oligomycin, inhibitor of the F₀ part of H⁺-ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis. *Oncogene* 21: 8149-57.
- Shidara Y, Yamagata K, Kanamori T, Nakano K, Kwong JQ, Manfredi G, Oda H, Ohta S (2005)** Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer Res* 65: 1655-63.
- Shin YK, Yoo BC, Chang HJ, Jeon E, Hong SH, Jung MS, Lim SJ, Park JG (2005)** Down-regulation of mitochondrial F₁F₀-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res* 65: 3162-70.
- Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, Gallou C, Beroud C, Demont J, Bouvier R, Schagger H, Godinot C (2002)** Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 23: 759-68.
- Singh KK, Desouki MM, Franklin RB, Costello LC (2006)** Mitochondrial aconitase and citrate metabolism in malignant and nonmalignant human prostate tissues. *Mol Cancer* 5: 14.
- Singh S, Khar A (2005)** Differential gene expression during apoptosis induced by a serum factor: Role of mitochondrial F₀-F₁ ATP synthase complex. *Apoptosis* 10: 1469-82.
- Sonenberg N (1996)** mRNA 5'cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. En: *Translational Control*. Págs.: 245-69. (Hershey JW B, Mathews MB, Sonenberg N, eds.). Cold Spring Harbor Lboratoty Press, New York, U.S.A.
- Springer EL (1980)** Comparative study of the cytoplasmic organelles of epithelial cell lines derived from human carcinomas and nonmalignant tissues. *Cancer Res* 40: 803-17.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002)** Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277: 44784-90.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R,**
-

- Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999)** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-6.
- Suzuki M, Neutzner A, Tjandra N, Youle RJ (2005)** Novel structure of the n terminus in yeast fis1 correlates with a specialized function in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 280: 21444-52.
- Swarts HG, Koenderink JB, Willems PH, De Pont JJ (2005)** The non-gastric H,K-ATPase is oligomycin-sensitive and can function as an H⁺,NH₄⁽⁺⁾-ATPase. *J Biol Chem* 280: 33115-22.
- Sweet S, Singh G (1999)** Changes in mitochondrial mass, membrane potential, and cellular adenosine triphosphate content during the cell cycle of human leukemic (hl-60) cells. *J Cell Physiol* 180: 91-6.
- Sylvestre J, Margeot A, Jacq C, Dujardin G, Corral-Debrinski M (2003)** The role of the 3' untranslated region in mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is conserved from yeast to human cells. *Mol Biol Cell* 14: 3848-56.
- Tan B, Piwnica-Worms D, Ratner L (2000)** Multidrug resistance transporters and modulation. *Curr Opin Oncol* 12: 450-8.
- Tan DJ, Bai RK, Wong LJ (2002)** Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. *Cancer Res* 62: 972-6.
- Thierbach R, Schulz TJ, Isken F, Voigt A, Mietzner B, Drewes G, von Kleist-Retzow JC, Wiesner RJ, Magnuson MA, Puccio H, Pfeiffer AF, Steinberg P, Ristow M (2005)** Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum Mol Genet* 14: 3857-64.
- Thompson JE, Thompson CB (2004)** Putting the rap on akt. *J Clin Oncol* 22 (20):4217-26.
- Tomiyama A, Serizawa S, Tachibana K, Sakurada K, Samejima H, Kuchino Y, Kitanaka C (2006)** Critical role for mitochondrial oxidative phosphorylation in the activation of tumor suppressors bax and bak. *J Natl Cancer Inst* 98: 1462-73.
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly-Y M, Gidlof S, Oldfors A, Wibom R, Tornell J, Jacobs HT, Larsson NG (2004)** Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial dna polymerase. *Nature* 429: 417-23.
- Tu BP, Kudlicki A, Rowicka M, McKnight SL (2005)** Logic of the yeast metabolic cycle: temporal compartmentalization of cellular processes. *Science* 310: 1152-8.
- Tvrdek P, Kuzela S, Houstek J (1992)** Low translational efficiency of the F1-ATPase beta-subunit mRNA largely accounts for the decreased ATPase content in brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett* 313: 23-26.
- Unwin RD, Craven RA, Harnden P, Hanrahan S, Totty N, Knowles M, Eardley I,**

- Selby PJ, Banks RE (2003)** Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics* 3: 1620-32.
- Vagner S, Galy B, Pyronnet S (2001)** Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* 2: 893-8.
- Vahsen N, Cande C, Briere JJ, Benit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schagger H, Rustin P, Kroemer G (2004)** AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J* 23: 4679-89.
- Valcarce C, Navarrete RM, Encabo P, Loeches E, Satrústegui J, Cuezva JM (1988)** Postnatal development of rat liver mitochondrial functions. The roles of protein synthesis and of adenine nucleotides. *J Biol Chem* 263: 7767-75.
- Van den Bogert C, Muus P, Haanen C, Pennings A, Melis TE, Kroon AM (1988)** Mitochondrial biogenesis and mitochondrial activity during the progression of the cell cycle of human leukemic cells. *Exp Cell Res* 178: 145-53.
- van Raaij MJ, Abrahams JP, Leslie AG, Walker JE (1996)** The structure of bovine F1-ATPase complexed with the antibiotic inhibitor aurovertin B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6913-7.
- Vander Heiden MG, Chandel NS, Li XX, Schumacker PT, Colombini M, Thompson CB (2000)** Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4666-71.
- Veitonmaki N, Cao R, Wu LH, Moser TL, Li B, Pizzo SV, Zhivotovsky B, Cao Y (2004)** Endothelial cell surface ATP synthase-triggered caspase-apoptotic pathway is essential for k1-5-induced antiangiogenesis. *Cancer Res* 64: 3679-86.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000)** Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102: 43-53.
- Vieira HL, Haouzi D, El Hamel C, Jacotot E, Belzacq AS, Brenner C, Kroemer G (2000)** Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ* 7: 1146-54.
- Vogelstein B, Kinzler KW (2004)** Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10: 789-99.
- von Ahsen O, Renken C, Perkins G, Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD (2000)** Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* 150 : 1027-36.
- Votyakova TV, Reynolds IJ (2001)** DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 79: 266-77.

BIBLIOGRAFÍA

- Vousden KH, Lu X (2002)** Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2: 594-604.
- Wajant H (2002)** The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296: 1635-6.
- Wallace DC (2005a)** Mitochondria and cancer: warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70: 363-74.
- Wallace DC (2005b)** A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39: 359-407.
- Walter DH, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM, Dimmeler S (1998)** Cyclosporin A inhibits apoptosis of human endothelial cells by preventing release of cytochrome C from mitochondria. *Circulation* 98: 1153-7.
- Wang C, Li Z, Lu Y, Du R, Katiyar S, Yang J, Fu M, Leader JE, Quong A, Novikoff PM, Pestell RG (2006)** Cyclin d1 repression of nuclear respiratory factor 1 integrates nuclear dna synthesis and mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11567-72.
- Wang X (2001)** The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15: 2922-33.
- Warburg O (1930)** En: *Metabolism of tumors*. Arnold Constable, London.
- Warburg O (1956a)** On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124: 269-70.
- Warburg O (1956b)** On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309-14.
- Weinhouse S (1956)** On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124: 267-9.
- Wulfkühle JD, Liotta LA, Petricoin EF (2003)** Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 267-75.
- Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, Keating MJ, Huang P (2005)** Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 65: 613-21.
- Yang JC, Cortopassi GA (1998)** Induction of the mitochondrial permeability transition causes release of the apoptogenic factor cytochrome c. *Free Radic Biol Med* 24: 624-31.
- Yasukawa T, Reyes A, Cluett TJ, Yang MY, Bowmaker M, Jacobs HT, Holt IJ (2006)** Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *EMBO J* 25: 5358-71.
- Yasukawa T, Yang MY, Jacobs HT, Holt IJ (2005)** A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Mol Cell* 18:

651-62.

- Yin PH, Lee HC, Chau GY, Wu YT, Li SH, Lui WY, Wei YH, Liu TY, Chi CW (2004)** Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 90: 2390-6.
- Yoshida M, Muneyuki E, Hisabori T (2001)** ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 669-77.
- Young LS, Murray PG (2003)** Epstein-barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 23: 5108-21.
- Young LS, Rickinson AB (2004)** Epstein-barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4: 757-68.
- Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang CV, Semenza GL (2007)** Hif-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in vhl-deficient renal cell carcinoma by repression of c-myc activity. *Cancer Cell* 11: 407-20.
- Zhang M, Mileykovskaya E, Dowhan W (2002)** Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 277: 43553-6.
- Zhu BZ, Carr AC, Frei B (2002)** Pyrrolidine dithiocarbamate is a potent antioxidant against hypochlorous acid-induced protein damage. *FEBS Lett* 532: 80-4.
- Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR (2001)** The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 92: 57-70.
- Zu XL, Guppy M (2004)** Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 459-65.

ANEXO 1

Características	No.	β -F1-ATPasa	Hsp60	β -F1/ Hsp60	HK-III	GAPDH	PK	BEC _{HK}	BEC _{GAPDH}	BEC _{PK}
Nevus	21	1.04 \pm 0.03	1.00 \pm 0.04	1.06 \pm 0.04	0.11 \pm 0.01	0.96 \pm 0.04	0.29 \pm 0.02	10.76 \pm 0.91	1.14 \pm 0.06	4.17 \pm 0.43
Melanoma	41	1.17 \pm 0.06*	1.15 \pm 0.06	1.06 \pm 0.05	0.19 \pm 0.02*	1.05 \pm 0.07	0.29 \pm 0.02	7.31 \pm 0.59*	1.12 \pm 0.07	4.17 \pm 0.28
Metástasis	13	1.22 \pm 0.11	1.20 \pm 0.06*	1.05 \pm 0.12	0.16 \pm 0.02	1.06 \pm 0.03	0.22 \pm 0.02*	7.63 \pm 1.05*	0.99 \pm 0.11	5.25 \pm 0.70

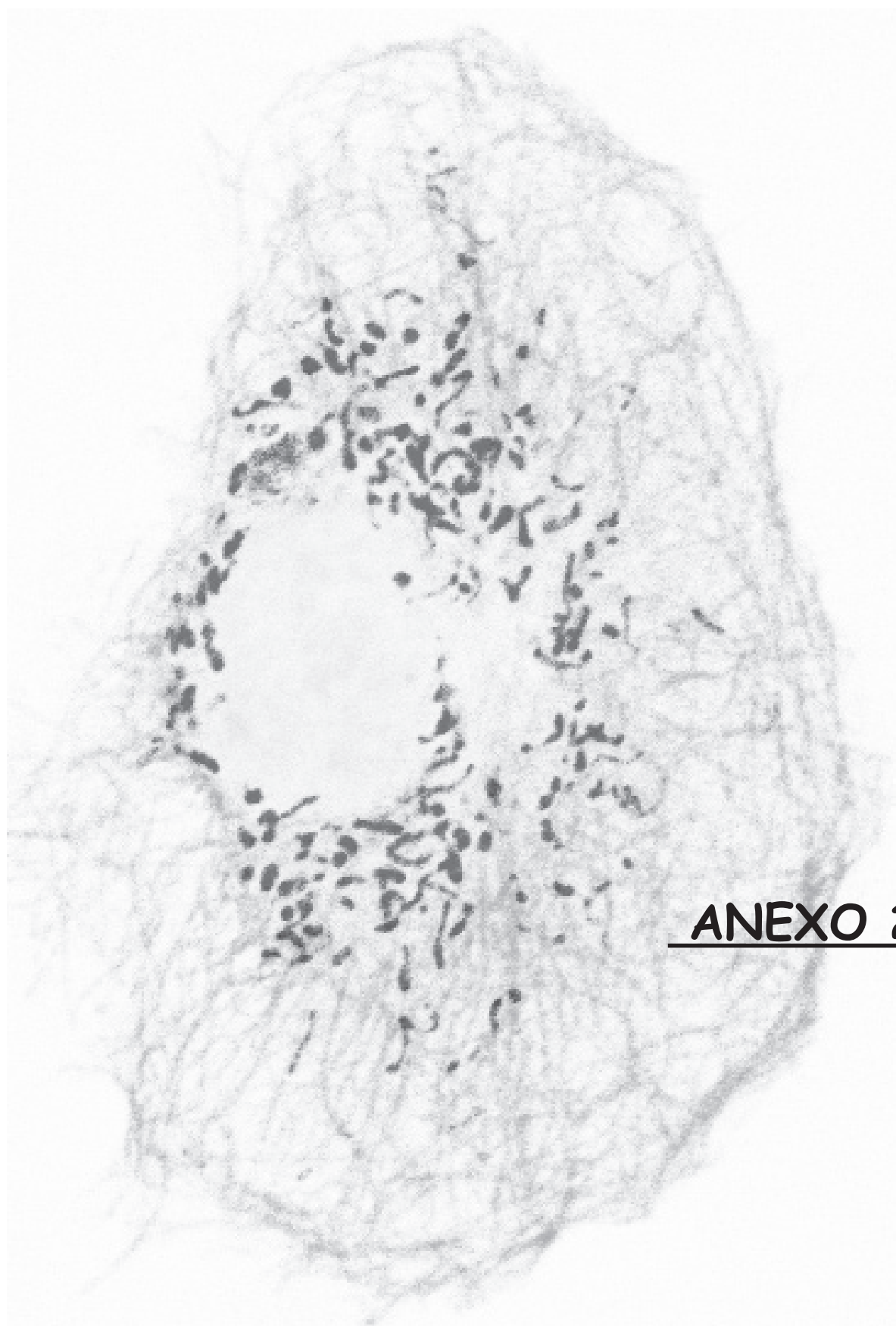
Tabla 4.1. Expresión de marcadores de la huella bioenergética en biopsias de piel (nevus y melanomas) y en biopsias de metástasis. No. indica el número de biopsias analizadas en cada grupo. Los niveles de expresión de los marcadores son expresados en unidades arbitrarias como media \pm S.E.M. *, $p < 0,05$ al comparar frente a las muestras de nevus con el test de t de Student.

SG				SLE			
Modelo	Variables	HR (95% CI)	p	Modelo	Variables	HR (95% CI)	p
Univariante	CONTINUAS			Univariante	CONTINUAS		
	<i>Breslow</i>	1.34 (1.11-1.61)	0.002		<i>Breslow</i>	1.24 (1.11-1.39)	<0.001
	<i>Mitosis</i>	1.06 (0.96-1.16)	0.234		<i>Mitosis</i>	1.12 (1.05-1.19)	0.001
	CATEGORICAS				CATEGORICAS		
Multivariante	<i>Úlceras</i>	1		Multivariante	<i>Úlceras</i>	1	
	N				N		
	N vs S	9.39 (2.37-37.26)	0.001		N vs S	5.04 (1.92-13.3)	0.001
	<i>Breslow/Úlceras</i>				<i>Breslow/Mitosis/Úlceras</i>		
Multivariante	<i>Breslow</i>	1.23 (1.01-1.49)	0.041	Multivariante	<i>Breslow</i>	1.16 (1.03-1.32)	0.016
	<i>Úlceras</i>		0.010		<i>Mitosis</i>	1.12 (1.03-1.20)	0.005
	N	1			<i>Úlceras</i>		
	N vs S	6.82 (1.59-29.1)			N	1	
					N vs S	3.57 (1.29-9.86)	0.014

Tabla 4.2. Regresión de Cox de las características clínico-patológicas de la población de estudio. SG-Supervivencia Global; SLE-Supervivencia Libre de Enfermedad. En negrita se indican los datos significativos, $p < 0,05$.

Características	No.	β -F1-ATPasa	Hsp60	β -F1/Hsp60	HK-III	GAPDH	PK	BEC _{HK}	BEC _{GAPDH}
Melanoma	41	1.17 ± 0.06	1.15 ± 0.06	1.06 ± 0.05	0.19 ± 0.02	1.05 ± 0.07	0.29 ± 0.02	7.31 ± 0.59	1.12 ± 0.07
<i>Clark</i>									
I+II	8	1.34 ± 0.21	1.59 ± 0.22	0.90 ± 0.13	0.24 ± 0.04	1.39 ± 0.19	0.35 ± 0.06	5.73 ± 1.93	0.69 ± 0.11
III	20	1.19 ± 0.07	1.07 ± 0.02*	1.12 ± 0.07	0.20 ± 0.03	1.05 ± 0.09	0.30 ± 0.02	6.79 ± 0.58	1.15 ± 0.08*
IV+V	13	1.03 ± 0.06	0.97 ± 0.04*	1.10 ± 0.09	0.13 ± 0.01*	0.84 ± 0.05*	0.23 ± 0.02	8.99 ± 0.95	1.36 ± 0.13*
<i>Breslow</i>									
<0.75	10	1.50 ± 0.19	1.51 ± 0.18	1.10 ± 0.17	0.28 ± 0.06	1.40 ± 0.16	0.41 ± 0.05	5.86 ± 1.62	0.84 ± 0.13
0.75-1.5	8	1.08 ± 0.06*	1.05 ± 0.02*	1.03 ± 0.05	0.19 ± 0.05	1.10 ± 0.17	0.27 ± 0.02*	6.43 ± 1.05	1.1 ± 0.14
1.5-3	12	1.06 ± 0.06*	1.00 ± 0.05*	1.10 ± 0.07	0.15 ± 0.02*	0.87 ± 0.07*	0.24 ± 0.01	7.87 ± 0.71	1.3 ± 0.10*
>3	11	1.07 ± 0.05*	1.05 ± 0.04*	1.05 ± 0.09	0.14 ± 0.01*	0.89 ± 0.05*	0.25 ± 0.02*	8.49 ± 1.09	1.2 ± 0.12*
<i>Mitosis</i>									
No	9	1.50 ± 0.21	1.54 ± 0.19	1.07 ± 0.19	0.28 ± 0.06	1.45 ± 0.17	0.41 ± 0.06	5.89 ± 1.81	0.76 ± 0.12
S	32	1.09 ± 0.04	1.04 ± 0.02*	1.06 ± 0.04	0.16 ± 0.01	0.94 ± 0.05*	0.25 ± 0.01*	7.73 ± 0.54	1.22 ± 0.07*
<i>Úlceras</i>									
No	28	1.22 ± 0.08	1.21 ± 0.08	1.06 ± 0.07	0.21 ± 0.03	1.14 ± 0.09	0.31 ± 0.03	7.01 ± 0.84	1.04 ± 0.08
S	13	1.07 ± 0.04	1.02 ± 0.03*	1.07 ± 0.06	0.14 ± 0.01*	0.87 ± 0.05*	0.25 ± 0.02*	7.91 ± 0.57	1.27 ± 0.09
<i>Edad</i>									
<60	15	1.09 ± 0.09	1.17 ± 0.06	0.98 ± 0.10	0.17 ± 0.02	1.09 ± 0.11	0.29 ± 0.02	7.90 ± 0.67	0.95 ± 0.08
>60	26	1.22 ± 0.07	1.14 ± 0.08	1.11 ± 0.05	0.15 ± 0.01	1.03 ± 0.08	0.26 ± 0.02	8.77 ± 0.66	1.22 ± 0.09*
<i>Crecimiento</i>									
Radial	8	1.35 ± 0.21	1.55 ± 0.23	0.97 ± 0.16	0.24 ± 0.04	1.41 ± 0.18	0.36 ± 0.06	6.05 ± 1.98	0.74 ± 0.15
Vertical	33	1.13 ± 0.05	1.04 ± 0.02	1.09 ± 0.05	0.17 ± 0.02	0.97 ± 0.06*	0.27 ± 0.02	7.63 ± 0.55	1.21 ± 0.07*
<i>Sexo</i>									
Mujer	21	1.22 ± 0.08	1.15 ± 0.06	1.09 ± 0.08	0.17 ± 0.02	0.98 ± 0.07	0.29 ± 0.03	7.01 ± 0.81	1.18 ± 0.09
Hombre	20	1.13 ± 0.08	1.15 ± 0.09	1.03 ± 0.05	0.20 ± 0.03	1.13 ± 0.11	0.28 ± 0.03	7.59 ± 0.86	1.04 ± 0.09

Tabla 4.3. Características clínico-patológicas y niveles de expresión de los marcadores metabólicos en biopsias de melanoma. No. indica el número de biopsias analizadas en cada grupo. Los niveles de expresión de los marcadores son expresados en unidades arbitrarias como media ± S.E.M. *, p < 0,050 al comparar frente a Clark I-II, Breslow <0,75, ausencia de ulceración o mitosis, edad menor de 60 años, crecimiento radial y tipo histológico de crecimiento superficial respectivamente con el test de t de Student.



ANEXO 2

ACCELERATED PUBLICATION

Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer

Antonio ISIDORO*, Marta MARTÍNEZ*, Pedro L. FERNÁNDEZ†, Álvaro D. ORTEGA*, Gema SANTAMARÍA*, Margarita CHAMORRO*, John C. REED‡ and José M. CUEZVA*¹

*Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa' (CBMSO), C.S.I.C.-U.A.M., Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain, †Departamento de Anatomía Patológica, IDIBAPS, Hospital Clínico y Universidad de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain, and ‡The Burnham Institute, 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, U.S.A.

Recent findings indicate that the expression of the β -catalytic subunit of the mitochondrial H^+ -ATP synthase (β -F₁-ATPase) is depressed in liver, kidney and colon carcinomas, providing further a bioenergetic signature of cancer that is associated with patient survival. In the present study, we performed an analysis of mitochondrial and glycolytic protein markers in breast, gastric and prostate adenocarcinomas, and in squamous oesophageal and lung carcinomas. The expression of mitochondrial and glycolytic markers varied significantly in these carcinomas, when compared

with paired normal tissues, with the exception of prostate cancer. Overall, the relative expression of β -F₁-ATPase was significantly reduced in breast and gastric adenocarcinomas, as well as in squamous oesophageal and lung carcinomas, strongly suggesting that alteration of the bioenergetic function of mitochondria is a hallmark of these types of cancer.

Key words: cancer, glycolysis, H^+ -ATP synthase, mitochondria.

INTRODUCTION

The H^+ -ATP synthase is the mitochondrial protein complex responsible for harnessing cellular ATP [1]. Efficient execution of programmed cell death also requires the activity and molecular components of the H^+ -ATP synthase [2–4]. Recently, decreased expression of the β -catalytic subunit of the H^+ -ATP synthase (β -F₁-ATPase or β F₁ in ratios) has been demonstrated in liver, kidney and colon carcinomas [5]. These findings provide molecular evidence that support an altered bioenergetic function of mitochondria in these types of cancer [5], in agreement with the Warburg hypothesis [6]. In this regard, we defined a bioenergetic cellular index (BEC index) that could be used to estimate tumour status [5]. The BEC index takes into consideration the expression level of a bioenergetic marker of mitochondria relative to a cellular glycolytic marker, which can be easily determined in tissue biopsies by immunohistochemical or immunoblotting analysis [5]. The down-regulation of the β -F₁-ATPase protein and assessment of the BEC index in colon carcinomas was shown further to have prognostic value in assessing the clinical outcome of patients with early-stage disease [5].

The possible impairment of the bioenergetic function of mitochondria in other human tumours has not been explored. In the present study, we have examined the expression of β -F₁-ATPase as protein marker of oxidative phosphorylation and of hsp60 (heat-shock protein 60) as marker of structural mitochondrial protein, in combination with two markers of the glycolytic pathway [GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and PK (pyruvate kinase)], in randomly selected biopsies of primary breast, gastric and prostate adenocarcinomas, and in squamous lung and oesophageal carcinomas, as well as in the normal tissue biopsies of the same patients. We show that the expression of β -F₁-ATPase, either alone or in combination

with mitochondrial and glycolytic markers (as defined by the BEC index), is significantly diminished in breast, gastric, lung and oesophageal cancers. Overall, the findings suggest that an impaired bioenergetic function of mitochondria is a hallmark of carcinogenesis in these human tissues. Furthermore, we suggest that the bioenergetic signature could provide a convenient tool for the diagnosis of patients bearing breast, lung, gastric and oesophageal cancers.

EXPERIMENTAL

Patient specimens

Frozen tissue sections of 17 μ m thickness, obtained from human biopsies of untreated patients with primary ductal invasive breast adenocarcinomas, gastric and prostate adenocarcinomas, and squamous oesophageal and lung carcinomas, were obtained from the Banco de Tejidos y Tumores, IDIBAPS (Instituto de Investigaciones Biomédicas Augusto Pi y Suñer), Hospital Clinic, Barcelona, Spain. The tissue sections of the tumour and normal tissue of each patient were analysed previously by an expert pathologist. All tissue samples used in the present study were anonymized and received in a coded form to protect patient confidentiality under IRB (Internal Review Board) approval.

Protein extraction

Approx. 20 tissue sections were extracted in 300 μ l of 50 mM Tris/HCl, pH 8, containing 150 mM NaCl, 0.02% (w/v) sodium azide, 0.1% (w/v) SDS, 1% (v/v) Nonidet P40, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml antitrypsin, 0.4 mM EDTA, 10 mM NaF and 0.75 mM PMSF at 4 °C for 30 min. After protein extraction, the

Abbreviations used: β -F₁-ATPase, β -subunit of the mitochondrial H^+ -ATP synthase; BEC index, bioenergetic cellular index; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; hsp60, heat-shock protein 60; PK, pyruvate kinase.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail jmcuezva@cbm.uam.es).

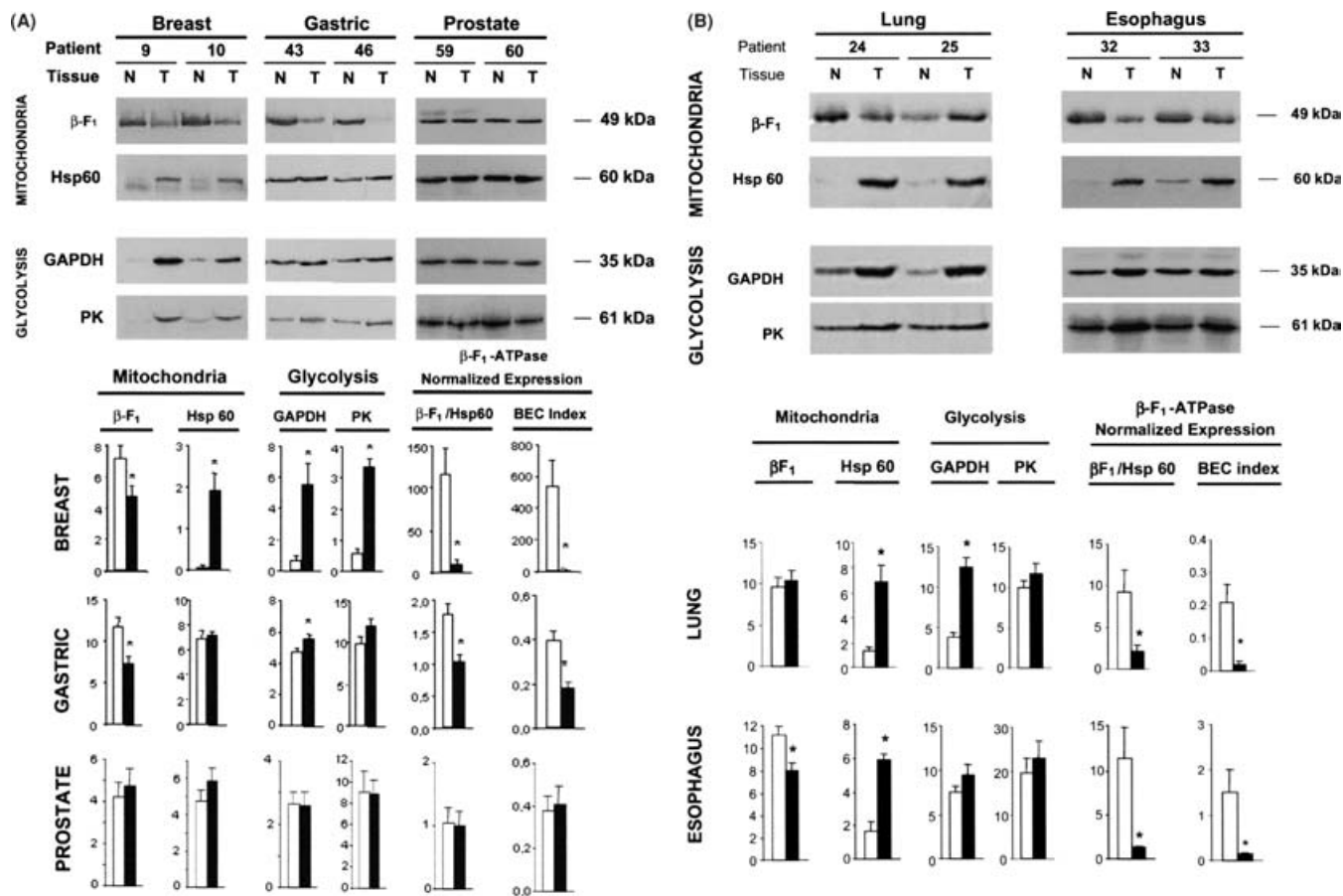


Figure 1 Expression of mitochondrial and glycolytic marker proteins in human tumours

Protein samples from normal (N) and tumour (T) biopsies from the same patient were fractionated by SDS/PAGE (10% or 15% gels) and then blotted with the corresponding antibodies. Markers of oxidative phosphorylation (β -F₁-ATPase) and structural function (hsp60) of the mitochondria and of the glycolytic pathway (GAPDH and PK) were studied. The electrophoretic migration (kDa) of each marker is shown on the right-hand side of the Figure. For illustration purposes, the results of two patients are shown for each type of carcinoma. The histograms show the means \pm S.E.M. of the cellular content of each marker as determined by densitometric analysis (arbitrary units) in normal (open bars) and tumour (closed bars) biopsies. The β F₁/hsp60 ratio and BEC index ($[\beta$ F₁/hsp60]/GAPDH ratio) provide a normalized expression level of β -F₁-ATPase for each sample. * $P < 0.05$ when compared with normal tissue by Student's *t* test. (A) Breast ($n = 10$), gastric ($n = 10$) and prostate ($n = 9$) adenocarcinomas. (B) Squamous lung ($n = 9$) and oesophageal ($n = 6$) carcinomas.

samples were centrifuged (15000 *g*) at 4 °C for 25 min. The protein concentration in the supernatants was determined with the Bradford reagent (Bio-Rad Protein Assay) using BSA as standard. Aliquots of the supernatants were stored at -80 °C until used.

Western blotting

Western blots for paired normal and tumour samples of the same patient were run in the same gel. Samples (15 or 30 μ g of protein) were subjected to SDS/PAGE (10% or 15% gels) followed by immunoblot analysis [7] using the appropriate dilution of various antisera. The antibodies used in the present study included: rabbit anti- β -F₁-ATPase at 1:20000 dilution [5]; mouse monoclonal anti-hsp60 (SPA 807; Stressgene, Victoria, Canada) at 1:2000 dilution; goat polyclonal anti-(muscle PK) at 1:2000 dilution and mouse monoclonal anti-GAPDH at 1:10000 dilution, both from Abcam (Cambridge, U.K.). Secondary horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-rabbit, anti-mouse or rabbit anti-goat antibodies (1:3000 dilution) were used for detection, which was accomplished using an enhanced chemiluminescence detection method (ECL[®]; Amersham Biosciences). Quantification of the intensity of the immunoreactive bands (arbitrary units) was

accomplished using a Kodak DC120 Zoom digital camera and the Kodak 1D Image Analysis Software for Windows. To calculate the normalized expression level of β -F₁-ATPase, the band intensity of β -F₁-ATPase was divided by the band intensity of hsp60 assayed for the same sample and in the same membrane. To calculate the BEC index [5], the aforementioned ratio was normalized relative to the band intensity of GAPDH. Statistical analysis was performed using Student's *t* test for paired samples.

RESULTS

Breast adenocarcinomas

The analysis of the expression level of mitochondrial and glycolytic marker proteins in ten primary breast ductal invasive adenocarcinomas and in their corresponding paired normal tissue biopsies revealed that the levels of β -F₁-ATPase protein were reduced in seven of the tumours analysed (Figure 1A). In contrast, the expression of mitochondrial hsp60 was increased in all of the tumours analysed (Figure 1A). The glycolytic GAPDH and PK markers were elevated in 80% and 100% of the tumours analysed respectively (Figure 1A). The normalized expression

level of β -F₁-ATPase, as assessed by the β F₁/hsp60 ratio, showed a significant reduction in breast adenocarcinomas when compared with normal breast samples (Figure 1A). Likewise, the BEC index ($[\beta$ F₁/hsp60]/GAPDH ratio) showed that breast cancer samples have a BEC index much lower than that in the normal breast tissue (Figure 1A).

Gastric adenocarcinomas

The analysis of the expression level of β -F₁-ATPase in ten gastric adenocarcinomas and in their corresponding paired normal tissue samples revealed that the marker was significantly reduced in 90% of the tumours analysed (Figure 1A). In contrast, the expression of the mitochondrial hsp60 was not affected in gastric adenocarcinomas when compared with normal tissues (Figure 1A). A slight, marginally significant increase was observed in the expression of GAPDH, whereas PK was not significantly affected in adenocarcinomas of the stomach (Figure 1A). The expression of β -F₁-ATPase relative to that of hsp60 revealed a significant decrease of this ratio in all the tumours when compared with normal tissue (Figure 1A). Consistent with the above findings, the BEC index showed a significant decrease in the adenocarcinomas (Figure 1A).

Prostate adenocarcinomas

No significant differences were observed in the expression level of β -F₁-ATPase and hsp60 in nine prostate adenocarcinomas when compared with their corresponding normal tissue controls (Figure 1A). Likewise, the expression of GAPDH and PK was not significantly affected in prostate cancer (Figure 1A). Therefore the normalized expression levels of β -F₁-ATPase and BEC index were not altered in prostate adenocarcinomas (Figure 1A).

Squamous carcinomas of the lung

The expression of β -F₁-ATPase was not significantly altered in the nine squamous lung carcinomas analysed when compared with normal tissue (Figure 1B). However, the expression of hsp60 was significantly increased in the tumours (Figure 1B). An increased expression of GAPDH was also observed in all the carcinomas when compared with normal samples (Figure 1B). In contrast, the expression of PK was not significantly altered in squamous lung carcinomas (Figure 1B). The expression of β -F₁-ATPase normalized to hsp60 revealed a significant reduction in the tumours when compared with the normal tissue (Figure 1B). Consistent with the above findings, the BEC index revealed a significant decrease in squamous lung carcinomas when compared with normal lung (Figure 1B).

Squamous carcinomas of the oesophagus

Five of the six squamous oesophageal carcinomas analysed showed a significant reduction in the expression of β -F₁-ATPase when compared with its normal paired sample (Figure 1B). Interestingly, the expression of the mitochondrial hsp60 marker was significantly increased in the carcinomas when compared with the normal tissue (Figure 1B). The expression of GAPDH and PK was not significantly altered in oesophageal carcinomas (Figure 1B). Consistent with these findings, both the normalized expression level of β -F₁-ATPase (β F₁/hsp60 ratio) and the BEC-index revealed a significant decrease in the carcinomas (Figure 1B).

DISCUSSION

Large-scale genomic [8,9] and proteomic [10] techniques have allowed the analysis of the expression pattern of the genes and proteins that are associated with the phenotype of a particular type of tumour, providing its so-called 'cancer signature' [11,12]. We have recently shown that the mitochondrial and glycolytic phenotypes of colon carcinomas provide a bioenergetic signature of cancer that has prognostic value in clinical practice [5]. In the present paper, we have analysed the expression of a set of mitochondrial and glycolytic markers in other types of common human carcinomas to explore whether or not the alteration of the bioenergetic signature is a generalized condition of cancer. We show that, with the exception of prostate adenocarcinomas, the bioenergetic signature of cancer, as assessed by the absolute expression level of β -F₁-ATPase (breast, oesophagus and stomach) or by its relative expression when considering other mitochondrial and cellular proteins (lung, breast, oesophagus and stomach), provides a molecular marker of carcinogenesis. Although the expression level of a protein marker does not necessarily reflect the cellular activity of the protein, the findings reported in the present paper, in addition to previous observations in liver, kidney and colon carcinomas [5], strongly suggest that altered bioenergetic function of mitochondria is a hallmark of carcinogenesis, as was hypothesized by Warburg almost 80 years ago [6]. The probable metabolic consequence of this impairment is the increased production of cellular ATP by enhanced rates of glycolysis. In this regard, we observed that, with the exception of prostate and oesophageal cancer, the GAPDH marker of the glycolytic pathway is increased in breast, gastric, lung, kidney and colon tumours (Figures 1A and 1B; and [5]). However, in those tumours where PK has been determined (the present study), we only observed a significant increase in the marker in breast tumours (Figures 1A and 1B). This finding could suggest that, in gastric and lung carcinomas, the relative cellular content and/or the regulation of the activity of PK are sufficient to channel through glycolysis the increase in carbon skeletons supplied by an augmented expression of GAPDH. In this regard, it has been documented that the induction of glycolytic genes by glucose is specific for some genes and not all of those that are induced are activated to the same extent and with the same kinetics [13].

The glycolytic and mitochondrial proteome of the different mammalian cell types differ substantially, both in terms of the relative expression level of the expressed proteins and in the expression of cell-type-specific isoforms, reflecting the relative relevance of the two energy-production pathways and the variable energetic demands of each cell type. In this regard, we observed a variable tissue response in the expression of the structural hsp60 marker of the mitochondria as a result of carcinogenesis. This finding is consistent with the de-regulation by carcinogenesis of the cell-type-specific programmes that control mitochondrial biogenesis and function in different mammalian tissues [14–17]. In this regard, the relative cellular increase in hsp60 expression observed in breast, lung and oesophageal cancer could suggest an activation of the programme of mitochondrial proliferation in these tumours as an attempt to compensate for the restrained cellular production of ATP by oxidative phosphorylation. In contrast, the lack of increase of hsp60 observed in gastric adenocarcinomas (Figure 1A), as well as in kidney and colon cancer [5], suggests that, although the functional differentiation [14,18,19] of the organelle is affected, in these types of cancer, there is no activation of mitochondrial proliferation. As recently discussed, the reduction of bioenergetic, structural and genetic markers of mitochondria observed in rat [20] and human hepatocarcinomas [21] is a paradigm of repression of the mechanisms

that regulate mitochondrial proliferation in the liver. Altogether, it appears that carcinogenesis differentially affects the phenotype of mitochondria in a tissue-specific manner, except in prostate cancer. In any case, we suggest that the BEC index could provide a convenient tool for the diagnosis of cancer patients bearing breast, lung, gastric and oesophageal tumours. The usefulness of the bioenergetic signature as a clinical marker should be explored in the near future in these types of cancer.

The mechanism by which the expression of β -F₁-ATPase is repressed in human cancers is not known. The expression of β -F₁-ATPase mRNA in human tumours of the brain, colon, eye, kidney, liver, lung, lymph nodes, mammary gland, placenta, prostate, skin, testis and uterus is up-regulated ($P < 0.05$) when compared with the normal tissue, as assessed by virtual Northern blotting using publicly available databases [22]. These findings strongly suggest that the control of β -F₁-ATPase expression in cancer is exerted at the level of translation of its mRNA. Indeed, translational control of β -F₁-ATPase expression has been documented in the liver during development [23–25], in rat hepatomas [7] and in the tissue-specific expression of this protein in mammalian tissues [25]. The mechanisms that control β -F₁-ATPase mRNA translation in mammalian cells are complex [25–28]. However, repression of β -F₁-ATPase mRNA translation is associated with increased expression and/or activity of specific β -F₁-ATPase mRNA-binding proteins that are regulated during development [25], in a tissue-specific manner [25] and in oncogenesis [7]. The molecular identification of these binding proteins, as well as the factors that regulate their RNA-binding activity should be targets of future cancer investigations. Likewise, the finding that β -F₁-ATPase expression is repressed in most tumours suggests that further efforts are required to understand the mechanistic contribution of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in cancer progression.

We thank Dr E. Campo (IDIBAPS) for the invaluable help he provided us at initial stages of this work and Dr J. Satrustegui [CBMSO (Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa')] for critical review of the manuscript before submission. A.I. is the recipient of a pre-doctoral fellowship from Fondo de Investigaciones Sanitarias (Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain). M.M., G.S. and A.D.O. are the recipients of pre-doctoral fellowships from Plan de Formación de Personal Investigador (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain) and Programa Nacional de Formación de Profesorado (Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Spain) respectively. This work was supported by grants 01/0380 from Ministerio de Sanidad y Consumo and BMC2001-0710 from Ministerio de Ciencia y Tecnología to J.M.C. (Spain), 01/1519 from Ministerio de Sanidad y Consumo and AECC (Asociación Española Contra el Cáncer) to P.L.F. (Spain) and from the National Institutes of Health (GM60554) to J.C.R. (U.S.A.). The CBMSO receives an institutional grant from Fundación Ramón Areces, Spain.

REFERENCES

- Yoshida, M., Muneyuki, E. and Hisabori, T. (2001) ATP synthase: a marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 669–677.
- Matsuyama, S., Xu, Q., Velours, J. and Reed, J. C. (1998) The mitochondrial F₀F₁-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol. Cell* **1**, 327–336.
- Harris, M. H., Vander Heiden, M. G., Kron, S. J. and Thompson, C. B. (2000) Role of oxidative phosphorylation in Bax toxicity. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3590–3596.
- Dey, R. and Moraes, C. T. (2000) Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate the protective effect of Bcl-x_L in osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 7087–7094.
- Cuezva, J. M., Krajewska, M., López de Heredia, M., Krajewski, S., Santamaría, G., Kim, H., Zapata, J. M., Marusawa, H., Chamorro, M. and Reed, J. C. (2002) The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res.* **62**, 6674–6681.
- Warburg, O. (1930) *Metabolism of tumors*, Arnold Constable, London.
- López de Heredia, M., Izquierdo, J. M. and Cuezva, J. M. (2000) A conserved mechanism for controlling the translation of β -F₁-ATPase mRNA between the fetal liver and cancer cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 7430–7437.
- Ramaswamy, S. and Golub, T. R. (2002) DNA microarrays in clinical oncology. *J. Clin. Oncol.* **20**, 1932–1941.
- Petricoin, E. F., Zoon, K. C., Kohn, E. C., Barrett, J. C. and Liotta, L. A. (2002) Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 683–695.
- Wulfkühle, J. D., Liotta, L. A. and Petricoin, E. F. (2003) Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 267–275.
- Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S. and Golub, T. R. (2003) A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat. Genet.* **33**, 49–54.
- Liotta, L. A. and Kohn, E. C. (2003) Cancer's deadly signature. *Nat. Genet.* **33**, 10–11.
- Roche, E., Assimakopoulos-Jeannot, F., Witters, L. A., Perruchoud, B., Yaney, G., Corkey, B., Asfari, M. and Prentki, M. (1997) Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic β -cell line (INS-1). *J. Biol. Chem.* **272**, 3091–3098.
- Cuezva, J. M., Ostronoff, L. K., Ricart, J., López de Heredia, M., Di Liegro, C. M. and Izquierdo, J. M. (1997) Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 365–377.
- Garesse, R. and Vallejo, C. G. (2001) Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* **263**, 1–16.
- Scarpulla, R. C. (2002) Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1576**, 1–14.
- Scarpulla, R. C. (2002) Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* **286**, 81–89.
- Valcarlos, C., Navarrete, R. M., Encabo, P., Loeches, E., Satrustegui, J. and Cuezva, J. M. (1988) Postnatal development of rat liver mitochondrial functions: the roles of protein synthesis and of adenine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **263**, 7767–7775.
- Luis, A. M., Izquierdo, J. M., Ostronoff, L. K., Salinas, M., Santarén, J. F. and Cuezva, J. M. (1993) Translational regulation of mitochondrial differentiation in neonatal rat liver: specific increase in the translational efficiency of the nuclear-encoded mitochondrial β -F₁-ATPase mRNA. *J. Biol. Chem.* **268**, 1868–1875.
- Lal, A., Lash, A. E., Altschul, S. F., Velculescu, V., Zhang, L., McLendon, R. E., Marra, M. A., Prange, C., Morin, P. J., Polyak, K. et al. (1999) A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res.* **59**, 5403–5407.
- Izquierdo, J. M., Ricart, J., Ostronoff, L. K., Egea, G. and Cuezva, J. M. (1995) Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of β -F₁-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. *J. Biol. Chem.* **270**, 10342–10350.
- Izquierdo, J. M. and Cuezva, J. M. (1997) Control of the translational efficiency of β -F₁-ATPase mRNA depends on the regulation of a protein that binds the 3' untranslated region of the mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5255–5268.
- Izquierdo, J. M. and Cuezva, J. M. (2000) Internal-ribosome-entry-site functional activity of the 3'-untranslated region of the mRNA for the β subunit of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Biochem. J.* **346**, 849–855.
- Di Liegro, C. M., Bellafiore, M., Izquierdo, J. M., Rantanen, A. and Cuezva, J. M. (2000) 3'-Untranslated regions of oxidative phosphorylation mRNAs function *in vivo* as enhancers of translation. *Biochem. J.* **352**, 109–115.
- Ricart, J., Izquierdo, J. M., Di Liegro, C. M. and Cuezva, J. M. (2002) The assembly of the ribonucleoprotein complex containing the mRNA of the β -subunit of the mitochondrial H⁺-ATP synthase requires the participation of two distal *cis*-acting elements and a complex set of cellular *trans*-acting proteins. *Biochem. J.* **365**, 417–428.

Received 7 October 2003/3 December 2003; accepted 19 December 2003

Published as BJ Immediate Publication 19 December 2003, DOI 10.1042/BJ20031541

Malignant Transformation of Human Cells by Constitutive Expression of Platelet-derived Growth Factor-BB*

Received for publication, January 12, 2005
Published, JBC Papers in Press, February 3, 2005, DOI 10.1074/jbc.M500411200

Baskaran Govindarajan^{‡§}, Asha Shah[‡], Cynthia Cohen[‡], Rebecca S. Arnold[‡],
Jeffrey Schechner[¶], Jun Chung[¶], Arthur M. Mercurio[¶], Rhoda Alani^{**}, Byungwoo Ryu^{**},
Chun-Yang Fan^{‡‡}, Jose M. Cuezva^{§§}, Marta Martinez^{§§}, and Jack L. Arbiser^{‡¶¶}

From the [‡]Departments of Dermatology, Pathology, and Laboratory Medicine, Emory University School of Medicine and Veterans Affairs Hospital, Atlanta, Georgia 30322, the [¶]Department of Dermatology, Yale University, New Haven, Connecticut 06511, ^{**}The Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center and Department of Dermatology, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland 21224, ^{¶¶}Beth Israel Deaconess Hospital, Division of Signal Transduction, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02138, the ^{‡‡}University of Arkansas for Medical Sciences and Veterans Affairs Medical Center, Little Rock, Arkansas 72205, and the ^{§§}Departamento de Biología Molecular and the Departamento de Matemáticas, Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa," Universidad Autónoma de Madrid, E-28049 Madrid, Spain

Platelet-derived growth factors (PDGFs) comprise a family of growth factors strongly implicated in human oncogenesis. A number of human tumors overexpress PDGF family members or have translocations activating PDGF receptors. Whereas the epidemiologic evidence implicating PDGF in human tumors is strong, malignant transformation of human cells by overexpression of PDGF has not been demonstrated. We have previously developed a human cell line by the sequential introduction of large T cells and telomerase, and we have demonstrated that these cells express functionally active PDGF receptor (PDGFR) β . In order to determine whether growth factor-mediated transformation of human cells could occur, these cells were transduced with a retrovirus encoding PDGF-BB. Constitutive expression of PDGF-BB led to malignant transformation in nude mice. This is the first demonstration of constitutive signaling causing malignant transformation of human cells. Some of the changes that occur because of constitutive growth factor expression can be reversed by the clinically approved tyrosine kinase inhibitor Glivec, whereas other changes are not reversible by tyrosine kinase inhibitors. Our model allows the assessment of epigenetic changes that occur during human carcinogenesis. In addition, these studies provide insight into the clinical failure of tyrosine kinase inhibitors as monotherapy for advanced malignancy.

The PDGF¹ family of peptides includes PDGF A, B, and C, and these ligands are capable of heterodimerization or ho-

modimerization (1, 2). The receptors for PDGF include PDGFR α and PDGFR β , and stimulation of these receptors results in a number of signaling events, including induction of phosphoinositol 3-kinase, mitogen-activated protein kinase, and reactive oxygen-NF κ B signaling. The first demonstration of PDGF in oncogenesis was the discovery that the transforming gene of the v-sis retrovirus is PDGF (1, 3, 4). More recently, PDGFR rearrangements have been demonstrated in a number of translocations, including dermatofibrosarcoma protuberans, in which a collagen type 1 transcript is fused to PDGFR β , and myeloproliferative disorders, including the PDGFR-tel translocation (5–7). Despite the discovery of constitutive PDGF-mediated tumorigenesis in human tumors, the steps involved in multistep tumorigenesis because of PDGF signaling are not well understood.

We previously derived a cell line (SV7tert) from a human angiosarcoma through the sequential introduction of SV40 large T cells and telomerase (8), and we subsequently demonstrated that PDGFR β is present and active in these cells, as well as in angiosarcomas, the benign tumors from which SV7tert cells were derived (9). Despite the introduction of two oncogenes into these cells, they fail to form tumors in nude mice. One potential reason for this failure is the presence of high levels of PDGF in the kidney but not the skin. Knockouts of PDGF or its receptors lead to severe defects in renal development, and these defects are the major cause of lethality in mice carrying these deficiencies (10, 11). In order to explore whether PDGF could cause these cells to become tumorigenic, we introduced constitutive expression of PDGF-BB using retroviral gene transfer into SV7tert cells.

Constitutive expression of PDGF-BB led to tumorigenesis in nude mice, with a prolonged latency of several months. This implied that epigenetic factors may play a role in PDGF-mediated tumorigenesis in human cells. Among the changes we observed in PDGF-transduced cells are high levels of reactive oxygen. We have shown previously (12) that carcinogenesis due to reactive oxygen results in silencing of the tumor suppressor p16^{ink4a}. Consistent with this, we observed decreased expression of p16^{ink4a} in tumor-derived tissue compared with the original PDGF-overexpressing cell line. The p16^{ink4a} silencing gene *Id-1* was highly expressed in tumor-derived tissue. Consistent with this hypothesis, tumorigenesis *in vivo* was accelerated by introduction of *Id-1* into PDGF-expressing SV7tert cells. We observed that *in vivo* growth selects for cells with a

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Supported in part by a Research Career Development award from the Dermatology Foundation.

¶¶ Supported by an Atorvastatin Research Award grant from Pfizer, NIAMS Grant RO1 AR47901 from the National Institutes of Health, and a Veterans Affairs merit award. To whom correspondence should be addressed: Dept. of Dermatology, Emory University School of Medicine, WMB 5309, 1639 Pierce Dr., Atlanta, GA 30322. Tel.: 404-727-5063; Fax: 404-727-0923; E-mail: jarbise@emory.edu.

¹ The abbreviations used are: PDGF, platelet-derived growth factor; PDGFR, PDGF receptor; VEGF, vascular endothelial growth factor; RT, reverse transcription; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MAP, mitogen-activated protein; BEC, bioenergetic cellular index; GFP, green fluorescent protein.

low bioenergetic index (BEC) (Warburg effect). Inhibition of PDGFR β signaling with the clinically approved inhibitor Glivec resulted in inhibition of some but not all of the changes observed because of constitutive expression of PDGF, implying that PDGF-induced carcinogenesis of human cells results in both reversible and irreversible changes. These irreversible changes may account in part for the failure of tyrosine kinase-based therapies in advanced malignancies.

MATERIALS AND METHODS

Overexpression of PDGF-BB in SV7tert Cells

SV7tert cells were infected with retroviruses encoding PDGF-BB or GFP as a vector control according to the method of Schechner and co-workers (13). Unselected pooled cells were used for further *in vitro* and *in vivo* analyses. PDGF overexpression was confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay.

Regulation of VEGF mRNA and Protein

For the analysis of protein expression of VEGF, cells were extracted in RIPA buffer (20 mM Tris buffer, pH 7.4, containing 0.14 M NaCl, 1% Nonidet P-40, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM PMSF, 5 μ g/ml aprotinin, pepstatin, and leupeptin), and immunoblotting was performed as described previously (14). A rabbit anti-VEGF (A-20) was obtained from Santa Cruz Biotechnology; a rabbit anti-actin antibody was from Sigma. Immunohistochemistry was performed as described by Arbiser *et al.* (16).

Apoptosis Assay

Adherent and nonadherent cells were harvested and assayed for apoptosis using annexin V-fluorescein isothiocyanate and propidium iodide (Fig. 4) (Biosource, Sunnysvale, CA) as described previously (14).

In Vivo Tumorigenesis

SV7tert, SV7tert PDGF, SV7tert PDGF-pLXSN, and SV7tert PDGF-*Id-1* (1×10^6) cells were injected into the flank of 6-week-old nude male mice (Charles River Breeding Laboratories). Three weeks after tumors became visible, they were excised and fixed in formalin for hematoxylin and eosin staining (Fig. 6). Tumor volume was measured using the formula ($\text{width}^2 \times \text{length}$) $\times 0.52$, where width represents the shortest dimension (Fig. 5). Transduction of SV7tert cells with *Id-1* in the absence of PDGF did not lead to tumorigenesis over a period of 6 months (data not shown).

p16 Expression Analysis in Tumor Tissue

RT-PCR for p16^{ink4a}—Total RNA was isolated using TriReagent (Sigma). RT-PCR was done with Promega RT-PCR kit (Fig. 7). Primers used were as follows: actin (728 bp), forward 5'-AAG ATG ACC CAG ATC ATG TTT GAG AC-3' and reverse 5'-CTG CTT GCT GAT CCA CAT CTG CTG G-3'; p16^{ink4a} (196 bp), forward 5'-CGA TTG AAA GAA CCA GAG AG-3' and reverse 5'-ATG GAC ATT TAC GGT AGT GG-3'. Reactions were performed in an Eppendorf master cycler. One PCR cycle at 45 °C for 45 min and 94 °C for 2 min followed by 40 PCR cycles under standard conditions with an annealing temperature of 60 °C were performed. β -Actin mRNA was used as a reference message to normalize the content of total RNA. p16^{ink4a} expression was calculated as the relative expression ratio to that of β -actin. All reactions were carried out in triplicate. Quantification was determined by triplicate repeats.

In Vitro Proliferation Assays—10,000 cells were plated in 24-well dishes. The next day, the medium was replaced with fresh medium containing the inhibitors or vehicle controls. Cells were incubated at 37 °C for 24 h, and cell number was determined in triplicate using a Coulter Counter (Hialeah, FL). Cells were treated with either vehicle (20 μ l of Me₂SO) or increasing concentrations (5, 10, 15, and 20 μ M concentration) of Glivec from a 10 mM stock in Me₂SO.

Methylation Analysis of p16^{ink4a}

Bisulfite Modification of DNA for Methylation-specific PCR—DNA samples, negative (human placental DNA; Sigma) and positive (CpGenome™ universal methylated human DNA; Intergen Co., New York) controls, were subjected to bisulfite modification prior to methylation-specific PCR using CpGenome™ DNA modification kit (Intergen Co.).

PCR Amplification and Primers—Amplification of the promoter region of the p16 gene was carried out in a Touchgene Gradient Thermal Cycler (Techne Inc., Princeton, NJ) in a 50- μ l PCR mixture containing 2 μ l of bisulfite-treated genomic DNA, dNTPs (each at 200 μ M), primers

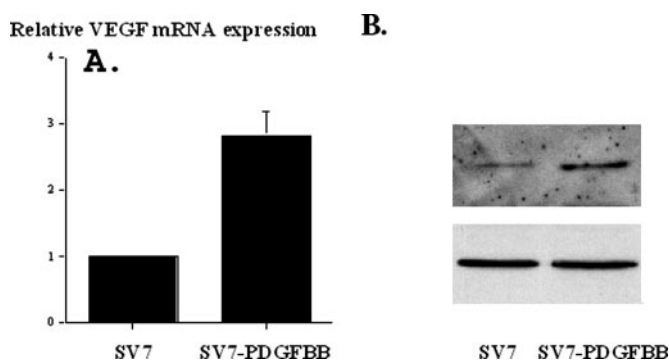


FIG. 1. Introduction of PDGF into SV7tert cells up-regulates VEGF mRNA and protein production. A, the amount of VEGF mRNA obtained from mock and PDGF-BB-expressing SV7tert cells was quantified by real time PCR. The data are presented as the mean ratio of VEGF to β -actin mRNA (\pm S.D.) from triplicate samples. B, extracts of these cells containing equivalent amounts of protein were analyzed for their relative amount of VEGF and actin by immunoblotting.

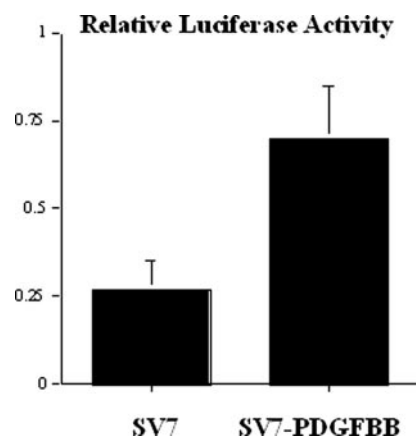


FIG. 2. Induction of VEGF by PDGF occurs in part at the level of transcription. A luciferase construct conjugated to the VEGF promoter was transfected into mock and PDGF-BB-expressing SV7tert cells. Luciferase activity (\pm S.D.) was assayed in triplicate.

(50 pmol each per reaction), 2.5 mM MgCl₂, and 1.25 units of Hotstar Taq (Qiagen, Valencia, CA) in $1 \times$ PCR buffer. All reagents were supplied with the Qiagen Hotstar Taq kit (Qiagen, Valencia, CA). The only exception was the dNTP mix (Roche Applied Science).

Primers for p16 gene were designed as follows: 5'-TTATTAGAGGG-TGGGGTGGATTGT-3' (sense) and 5'-CAACCCCAACCAACCAT-AA-3' (antisense) for the unmethylated reactions; 5'-TTATTAGAGGG-TGGGGCGGATCGC-3' (sense) and 5'-GACCCCGAACCGCGACCGT-AA-3' (antisense) for the methylated reactions as described previously (38). Both primers were purchased from Operon Technologies (Alameda, CA). The PCR conditions were as follows: initial denaturation and hot start at 95 °C for 15 min, then 40 cycles consisting of 30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C (unmethylated reactions) or 65 °C (methylated reactions), and 1 min at 72 °C followed by a final 5-min extension at 72 °C. Positive and negative control DNA samples and controls without DNA were used for each set of PCRs.

Introduction of Id-1 Accelerates Tumorigenesis in Vivo

SV7tert PDGF cells were infected with retroviruses encoding pLXSN or a constitutively active *Id-1* (15). The unselected cells were pooled and were used for further *in vivo* and *in vitro* experiments. Overexpression of *Id-1* was confirmed by Western analysis (Fig. 9).

For *Id-1* immunoblot experiments, 30–40- μ g aliquots of cell and tissue lysates prepared as above were separated by 15% SDS-PAGE and electrotransferred to polyvinylidene fluoride membranes (Immobilon P, Millipore). The membrane was blocked and then incubated with primary antibody (*Id-1* polyclonal antibody from Santa Cruz Biotechnology, SC-488) in TNET buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.1% Tween 20) overnight at 4 °C. Antigen-antibody complexes were detected and visualized after incubation for 1 h with appropriate horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies (Am-

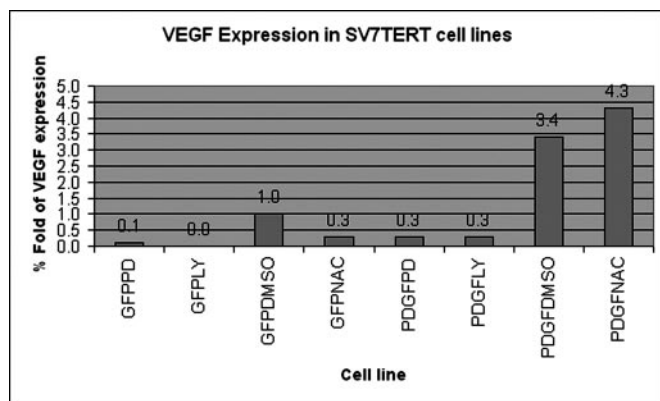


FIG. 3. **Regulation of VEGF mRNA by MAP kinase and phosphoinositol 3-kinase signaling.** RT-PCR of VEGF in each column is normalized to β -actin. PD indicates PD98059, an inhibitor of MAP kinase kinase; LY indicates LY294002, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase; and NAC indicates *N*-acetylcysteine. The values for Me₂SO controls in the case of GFP-expressing cells have been normalized to 1.0.

ersham Biosciences, 1:10,000 dilution) and enhanced chemiluminescence reagents (ECLTM Western blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences).

Measurement of BEC

The human angiomyolipoma SV7tert cells (parental, PDGF, tumors 1 and 2) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with a mixture containing 400 μ M of each of the following amino acids: Ala, Asn, Asp, Glu, and Pro, and 1 mM Gln (Merck), plus 10% fetal calf serum (Biological Industries), 0.6% penicillin, and 1% streptomycin (Sigma) in 7% CO₂ atmosphere (Fig. 10). Cells were recovered from the plates by trypsin treatment and washed twice with phosphate-buffered saline. The recovered cells were lysed in a buffer containing 5 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5% Triton X-100, 20 mM EDTA, 1 μ g/ml pepstatin, and 1 μ g/ml leupeptin at 4 °C for 10 min. After protein extraction, the samples were centrifuged (15,000 \times g) at 4 °C for 5 min. The protein concentration in the supernatants was determined with the Bradford reagent (Bio-Rad Protein Assay) using bovine serum albumin as standard. Aliquots of the supernatants were stored at -80 °C until used.

Cellular proteins (10 μ g of protein) were fractionated on 10% SDS-PAGE and then transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). Western blotting of the membranes was essentially carried out as described previously using the appropriate dilution of various antisera. The antibodies used in this study are as follows: rabbit anti- β -F₁-ATPase at a dilution of 1:20,000 (22); mouse monoclonal anti-hsp60 (SPA 807, StressGen, Victoria, Canada) at a dilution of 1:2,000; mouse monoclonal anti- α -tubulin (Sigma) at a dilution of 1:2,000; goat polyclonal anti-muscle pyruvate kinase at a dilution of 1:2,000 and mouse monoclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at a dilution of 1:10,000, both from Abcam (Cambridge, UK). Secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse or rabbit anti-goat antibody (1:3,000 dilution) were used for detection, which was accomplished by using an enhanced chemiluminescence detection method (Amersham Biosciences). Quantification of the intensity of the immunoreactive bands (arbitrary units) was accomplished using a Kodak DC120 zoom digital camera and the Quantity One software package (Bio-Rad). To calculate the cellular expression level of the markers, the band intensity of β -F₁-ATPase, Hsp 60, GAPDH, and pyruvate kinase was divided by the band intensity of α -tubulin. The β -F₁-ATPase/Hsp60 ratio and BEC index (β -F₁-ATPase/Hsp60/GAPDH) (22) were also calculated.

PDGF Secretion Assay

PDGF secreted into the growth media was measured using Quantikine human PDGF-AB immunoassay kit from R & D Systems (catalog number DHD00B), and the assay was conducted according to the manufacturer's procedure. Immunohistochemical analysis of tumors for PDGF-BB and VEGF was carried out as described previously by Arbiser (16).

Reactive Oxygen Measurements

Hydrogen peroxide and superoxide levels were quantitated by the use of dichlorofluorescein and dihydroethidine fluorescence, respectively (Fig. 11), according to the method of Arbiser (17).

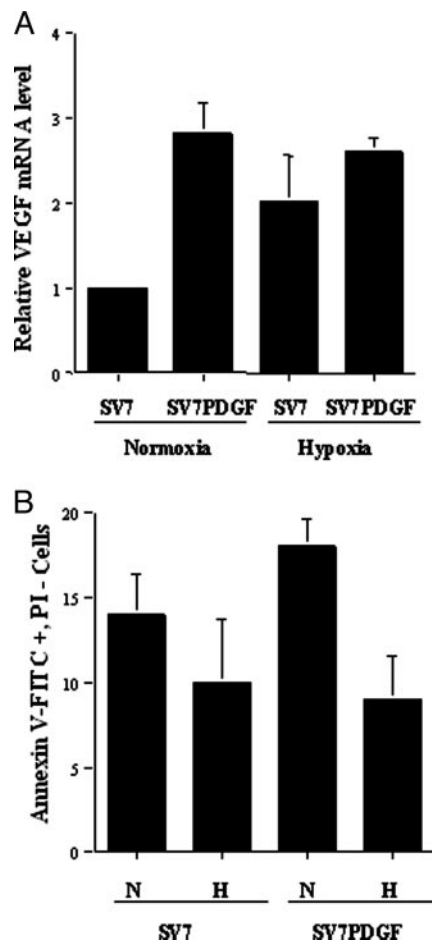


FIG. 4. A, VEGF mRNA was quantified by real time PCR in mock and PDGF-BB stably expressing SV7 cells under low serum (0.5% fetal bovine serum) for 24 h in either normoxia or hypoxia. Data are presented as the mean ratio of VEGF to β -actin mRNA (\pm S.D.). B, the cells characterized above were incubated with 0.5% fetal bovine serum in either normoxia (N) or hypoxia (H) for 24 h and stained with annexin V-fluorescein isothiocyanate (V-FITC) and propidium iodide (PI).

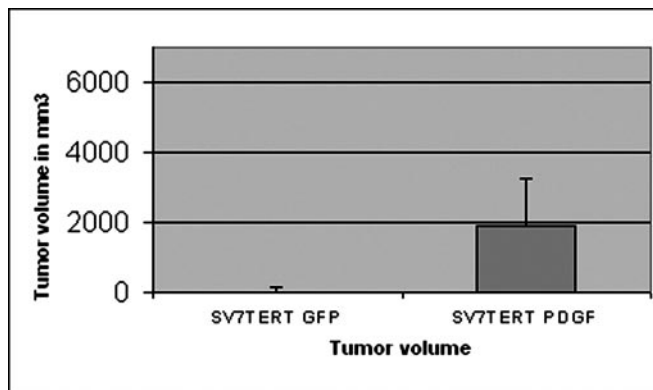


FIG. 5. **Introduction of PDGF into SV7tert cells converts them to a tumorigenic phenotype.** One million cells were injected subcutaneously into nude mice, and tumor volume was calculated by the formula (width² \times length) \times 0.52, where width represents the smaller dimension of the tumor. The PDGF-expressing tumors were significantly larger than the vector control (GFP) tumors ($p < 0.05$).

RESULTS

PDGF-BB Overexpression Causes Induction of VEGF at the Level of Transcription and Enhances Survival under Hypoxic Conditions—PDGF-overexpressing SV7tert cells demonstrated increased levels of VEGF mRNA and protein (Figs. 1 and 2). To determine at which level this occurred, a VEGF-luciferase construct was transfected into PDGF-overexpressing and control

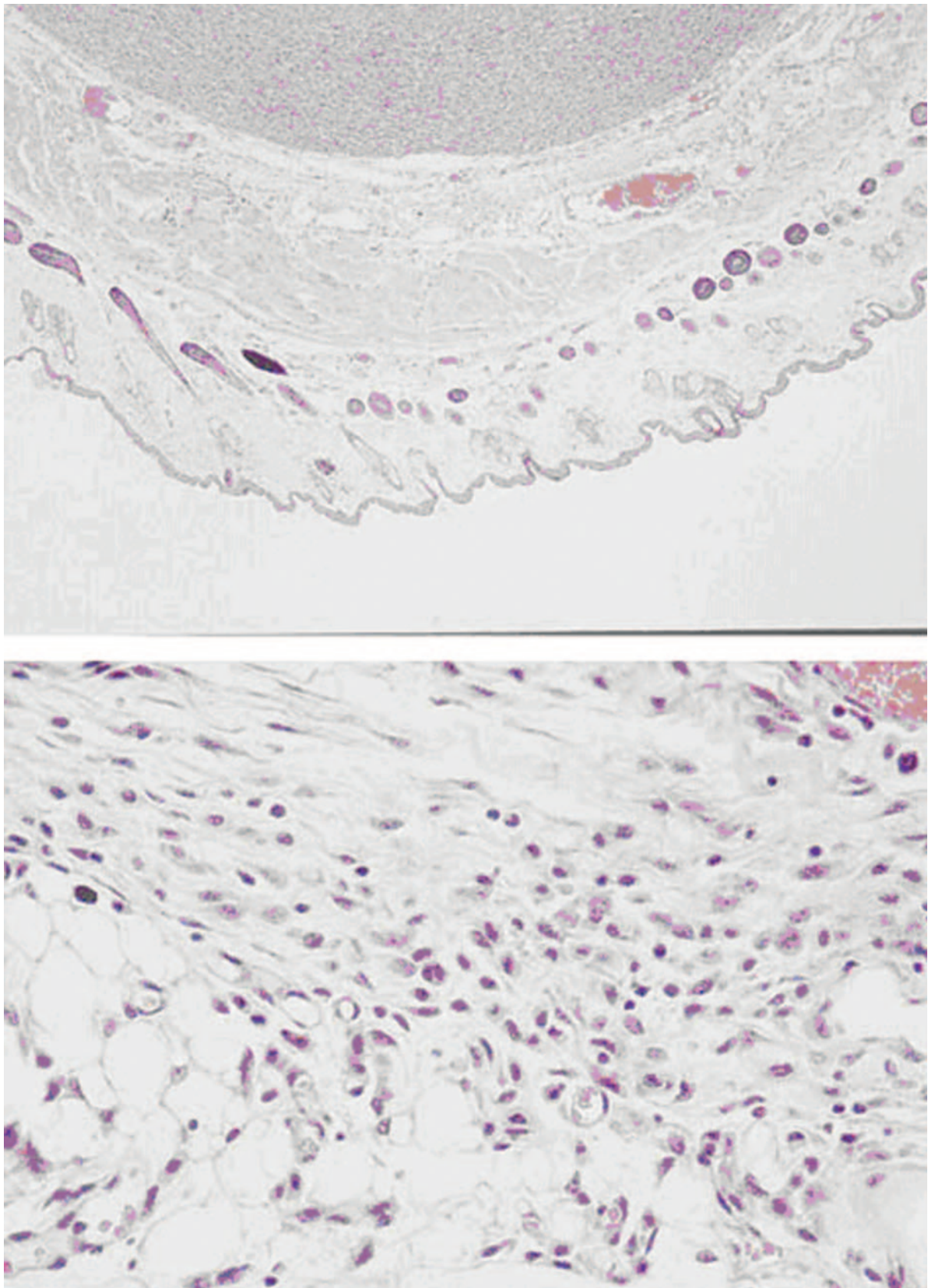


FIG. 6. Histology of PDGF-expressing SV7tert cells at low power $\times 100$ (A) and high power $\times 400$ (B).

cells according to the method of Shaw *et al.* (18). Constitutive expression of PDGF-BB led to a significant induction of luciferase activity, indicating that a major mode of VEGF regulation by PDGF-BB in this system is at the level of transcription.

Because VEGF is highly regulated at the level of transcription, we examined the effects of signal transduction inhibitors of VEGF mRNA expression. The induction of VEGF mRNA by PDGF-BB was blocked by the phosphoinositol 3-kinase inhib-

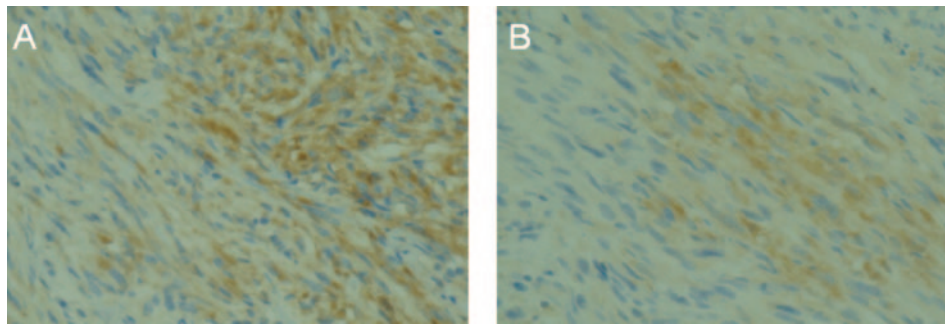


FIG. 7. Immunohistochemistry of SV7tert-derived tumors for PDGF-BB (A) and VEGF (B).

itor LY294002 and the MAP kinase kinase inhibitor PD98059. Most surprisingly, treatment with the antioxidant *N*-acetylcysteine led to a slight induction of VEGF mRNA (Fig. 3). We then examined the effect of SV7tert parental cells and PDGF-expressing SV7tert to hypoxia. Exposure of parental SV7tert cells to hypoxia led to a robust induction of VEGF mRNA. SV7tert cells expressing PDGF showed an increased base-line expression of VEGF mRNA but a minimal increase because of hypoxia (Fig. 4). We also examined the effect of hypoxia on apoptosis in SV7tert and PDGF-expressing cells. Hypoxia decreased the rate of apoptosis in both cells, but the decrease in apoptosis was more marked in PDGF-expressing cells (Fig. 4).

PDGF-BB Overexpression Causes Tumor Growth in Vivo—Equal numbers of SV7tert PDGF and vector control cells were implanted into nude mice. PDGF-expressing cells formed slowly growing but steadily progressive tumors. No tumors were observed in the vector control cells (Fig. 5). Histologically, tumors demonstrated pseudoencapsulation, with malignant cells infiltrating muscle and adipose tissue (Fig. 6). Mice were observed up to a period of 6 months, at which time mice were sacrificed. Abundant expression of PDGF-BB and VEGF was observed *in vivo* (Fig. 7).

In Vivo Growth Selects for High Levels of PDGF Secretion—Results from the PDGF secretion assay on the different SV7tert cell lines prior to and after implantation show an increase in the levels of PDGF secreted in the media from tumor-derived cell lines. PDGF levels were calculated per million cells. PDGF radioimmunoassay shows the following levels of PDGF-BB secretion per million cells: assay shows SV7tert at 164.44, SV7tert PDGF at 1240, SV7tert PDGF tumor 1 at 22827.4, and SV7tert PDGF tumor at 8697.4 pg of PDGF/million cells. Thus, in tumor 1, the cells secreted over 18-fold more PDGF than cells prior to implantation, and in tumor 2, the tumor-derived cells secreted 7-fold more PDGF than cells prior to implantation. Thus, *in vivo* growth selects for high levels of PDGF secretion, providing compelling evidence for a role of PDGF-BB in *in vivo* tumorigenesis.

p16^{ink4a} Expression Is Decreased during In Vivo Growth—We have shown previously that loss of p16^{ink4a} occurs in reactive oxygen-induced tumors and in spontaneous tumors in mice heterozygous for tuberlin (12, 19). Thus, we hypothesized that loss of p16^{ink4a} could occur during the long latency period of tumor formation in human cells. We examined expression of p16^{ink4a} in parental, PDGF-expressing cells prior to implantation and in tumor tissue derived after *in vivo* growth. p16^{ink4a} expression was markedly diminished in tumor tissue compared with cells prior to *in vivo* implantation (Fig. 8).

Hypermethylation and transcriptional silencing have been established as common mechanisms for the decreased expression of p16^{ink4a} in human tumors. Analysis of the p16^{ink4a} promoter failed to reveal evidence for p16^{ink4a} hypermethylation (data not shown). We then examined the expression of proteins known to silence p16^{ink4a} expression, namely BMI-1



FIG. 8. RT-PCR of p16^{ink4a} in SV7tert cells prior to and after implantation into nude mice. Note decreased expression of p16^{ink4a} in RNA derived from tumors (tumor 1 and tumor 2) compared with cells prior to implantation. RT-PCR of p16^{ink4a} in cells prior to and after tumor development. Lane M, marker; lane 1, SV7tert PDGF tumor 1; lane 2, SV7tert PDGF tumor 2; lane 3, SV7tert PDGF; lane 4, SV7tert.

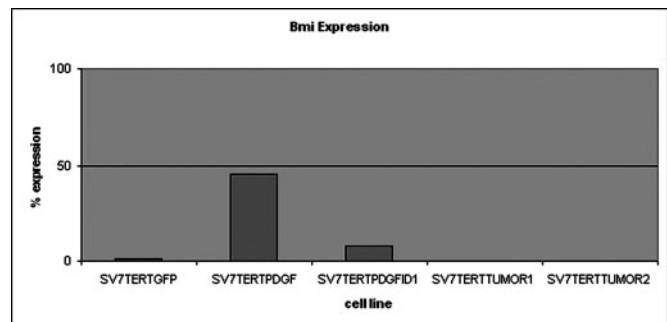


FIG. 9. PDGF causes induction of the polycomb gene *bmi-1*. RT-PCR levels of *bmi-1* are normalized to β -actin.

and *Id-1*. BMI-1 expression is increased in the SV7tert cells expressing PDGF prior to implantation but is decreased in tumor-derived cells, making it unlikely that BMI-1 is the sole mediator of p16^{ink4a} silencing (Fig. 9). In contrast, the helix-loop-helix protein *Id-1* is expressed in tumor-derived tissue (data not shown). In order to see whether forced expression of *Id-1* had a functional effect on tumorigenesis, SV7tert PDGF and parental cells were infected with a retroviral vector encoding *Id-1* or a control retroviral vector. Tumorigenesis was enhanced by the co-expression of *Id-1* and PDGF-BB (Fig. 10). Expression of *Id-1* alone was insufficient to cause malignant transformation of SV7tert cells *in vivo* (data not shown).

In Vivo Growth Selects for Cells with Glycolytic Metabolism (Warburg Effect)—Highly aggressive tumor cells have long been known to suppress respiration in favor of glycolysis, but the reasons for this switch remain unclear (20, 21). Cuezva *et al.* (22) have demonstrated that tumors that have a high level of glycolysis have a poor prognosis and have quantitated BEC as a ratio of mitochondrial to glycolytic enzymes, as a measure of glycolytic metabolism. Cells with a high BEC have a high level of respiration, and cells with a low BEC are associated with glycolytic metabolism and poor prognosis. SV7tert PDGF cells prior to implantation show a high BEC, whereas tumor-

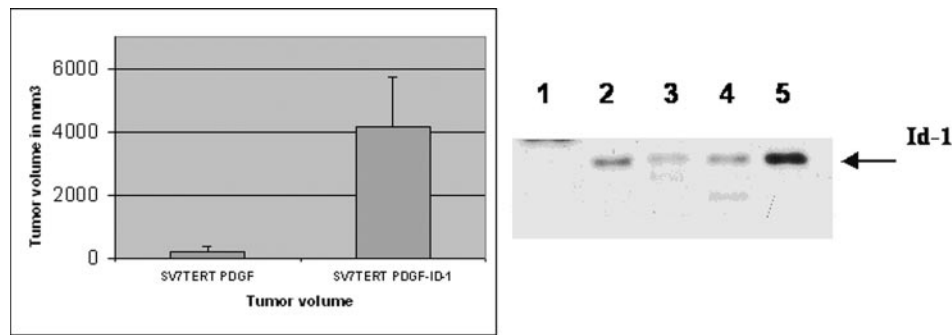


FIG. 10. **Introduction of *Id-1* into SV7tert PDGF cells accelerates the tumorigenic phenotype.** The right panel is a Western analysis. Lane 1 is the molecular weight marker; lane 2 represents protein from SV7tert PDGF; lane 3 is SV7tert (parental cells); lane 4 is from SV7tert transduced with *Id-1* alone; and lane 5 represents protein from SV7tert PDGF cells transduced with *Id-1*. One million cells were injected subcutaneously into nude mice, and tumor volume was calculated by the formula (width² × length) × 0.52, where width represents the smaller dimension of the tumor. The *Id-1*-expressing tumors were significantly larger than the control (SV7tert PDGF) tumors ($p < 0.05$).

derived cells show a decreased BEC, consistent with a shift to glycolytic metabolism (Fig. 11). Thus, *in vivo* growth selects for cells with a glycolytic metabolism and suggests that glycolysis or suppression of respiration may enhance tumor growth *in vivo*. In order to see whether the changes in glycolysis were dependent on PDGF-BB, we repeated the glycolytic flux observations in the presence and absence of Glivec. Most surprisingly, Glivec treatment caused increased glycolysis in all the PDGF-BB-secreting cell lines (Fig. 12). In addition, Glivec treatment inhibited proliferation in all cell lines in a dose-dependent fashion (Fig. 13), indicating that these activities are dependent in part on sustained production of PDGF-BB.

PDGF-BB is known to activate reactive oxygen species acutely, but the chronic effects of PDGF stimulation are not well characterized. We examined the expression of hydrogen peroxide and superoxide in parental PDGF-expressing and tumor-derived cells. Of interest, cells prior to implantation revealed high level expression of both hydrogen peroxide and superoxide. However, tumor-derived cells have decreased levels of superoxide, yet have persistently elevated levels of hydrogen peroxide (Fig. 14). Treatment of all cell lines with the clinically approved PDGFRb tyrosine kinase inhibitor Glivec did not result in any changes in reactive oxygen species (data not shown).

DISCUSSION

Rapid transformation of human cells has been accomplished by introduction of telomerase, large T antigen, and Ras (23). These studies elegantly demonstrate the steps required for full transformation of human cells and allow the assessment of epigenetic events that occur over long term human carcinogenesis. We have previously established a cell line (SV7tert) from an angiomyolipoma, and we found that it expresses functional PDGFRβ (8, 9). In order to determine whether autocrine PDGF-PDGFRβ signaling could result in malignant transformation, we retrovirally transduced PDGF-BB into SV7tert cells. Overexpression of PDGF-BB led to up-regulation of vascular endothelial growth factor, and reactive oxygen species, as well as resistance to apoptosis under hypoxic conditions. Implantation of SV7tert cells expressing PDGF-BB led to the development of tumors in nude mice, whereas tumors were not observed in vector control cells. Tumors took several months to appear, suggesting further epigenetic events.

Investigations from our laboratory and others suggest a linkage between inactivation of specific transcription factors and activation of specific signaling pathways. Our initial studies demonstrated that in a model p53-deficient system, angiosarcoma and phosphatidylinositol 3-kinase activation are required for tumorigenesis, but MAP kinase is not required (24, 25). Further studies have revealed a linkage between reactive oxy-

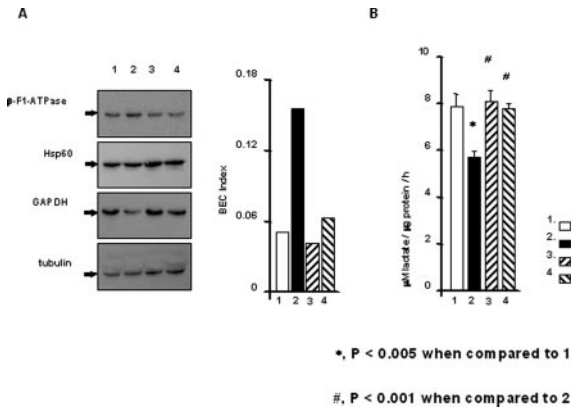


FIG. 11. **Tumor-derived SV7tert PDGF cells have undergone the switch to glycolytic metabolism.** Parental (SV7tert), PDGF transduced SV7tert cells prior to implantation *in vivo* (SV7tert PDGF), and cells derived from SV7tert PDGF cells (tumor 1 and tumor 2) were examined for expression of mitochondrial proteins (A) (β -F₁-ATPase and Hsp60) and glycolytic proteins (GAPDH and pyruvate kinase) and expression ratios (β -F₁-ATPase/Hsp60) and BEC index (β -F₁-ATPase/Hsp60/GAPDH) were also calculated (B).

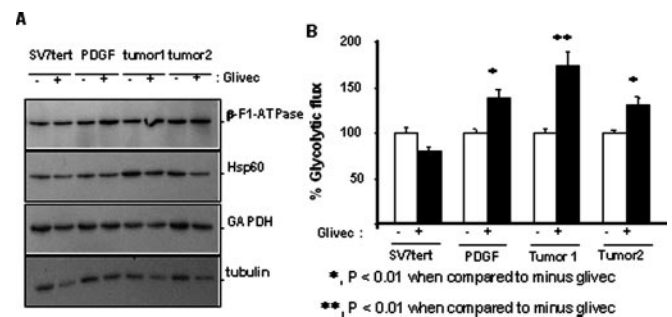


FIG. 12. Parental (SV7tert), PDGF-transduced SV7tert cells prior to implantation *in vivo* (SV7tert PDGF), and cells derived from SV7tert PDGF cells (tumor 1 and tumor 2) were examined for expression of mitochondrial proteins (β -F₁-ATPase, Hsp60) (A) and glycolytic proteins in the presence and absence of Glivec (GAPDH and pyruvate kinase), and glycolytic flux was estimated (B).

gen and MAP kinase in p16-deficient tumors, with phosphatidylinositol 3-kinase playing an additional role in angiogenesis and in the prevention of apoptosis (26–29). In tumors derived from mice heterozygous for tuberlin, we have noted an obligatory role of MAP kinase for tumorigenesis, as well as loss of p16 in these tumors (19). We introduced PDGF-BB into human angiomyolipoma cells, which contain a functional PDGFRβ, in order to determine whether these cells could undergo autocrine transformation. Consistent with our predictions, PDGF overexpression was transforming in human cells. This overexpres-

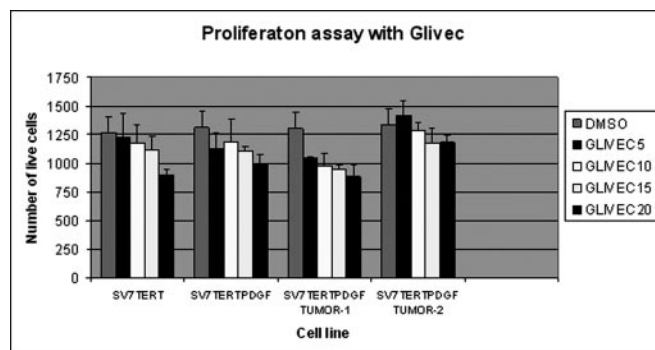


FIG. 13. Glivec, an inhibitor of PDGFR β , causes decreased proliferation of SV7tert cells prior to and after implantation in a dose-dependent fashion.

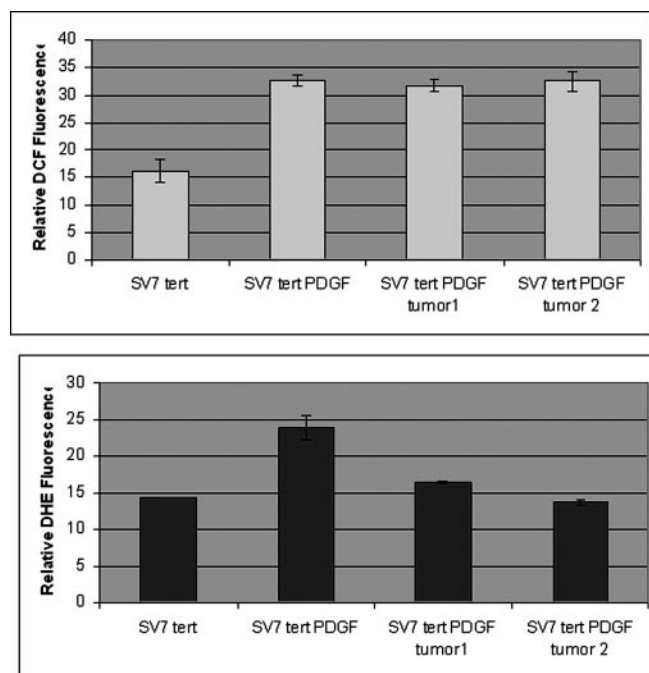


FIG. 14. PDGF induces reactive oxygen species chronically in SV7tert cells. They axis represents relative measures of hydrogen peroxide production (dichlorofluorescein fluorescence) and superoxide production (dihydroethidine fluorescence).

sion was accompanied by increased production of reactive oxygen species. We thus predicted, based upon prior studies, that p16^{ink4a} expression would be decreased in cells that were derived from tumors compared with cells prior to implantation. It is thus likely that the process of *in vivo* growth selects for decreased expression of p16^{ink4a}. In order to determine the mechanism of decreased p16 expression, we performed methylation analysis of genomic DNA from cells prior to and after tumor formation. Hypermethylation did not occur. A second mechanism of p16 silencing is through promoter-binding proteins. Among these proteins are the transcription factor *Id-1* and the polycomb protein BMI-1 (30, 31). BMI-1 is up-regulated as an early event in PDGF-induced tumorigenesis, and expression is decreased in tumor-derived cells, whereas *Id-1* is highly expressed in PDGF-induced tumors. Consistent with this observation, *Id-1* overexpression accelerated PDGF-induced tumorigenesis *in vivo*.

Targeted therapies, including Glivec, Iressa, and Herceptin, are finding increased use in cancer therapy. Despite this, many tumors are resistant to these therapies, despite the fact that relevant tyrosine kinases are activated in the tumor cells. Our findings provide a potential explanation for the failure of tar-

geted therapies. We demonstrate that constitutive expression of a growth factor can cause malignant transformation of human cells. We also demonstrate that the tyrosine kinase inhibitor, Glivec, exhibits biological activity against cells prior to and after selection for *in vivo* growth. However, not all of the changes that occur after transformation can be reversed by Glivec, implying that metabolic changes occur that gain independence from growth factor stimulation. Most surprisingly, glycolysis was potentiated by Glivec in PDGF-secreting tumors. Tumor-derived cells are selected for glycolytic growth, so the potentiation of glycolysis by Glivec may explain in part the lack of efficacy of Glivec in highly advanced tumors. Glivec may be more efficacious against earlier tumors that have a greater dependence on respiratory metabolism. Indeed, one form of Glivec resistance in chronic myelogenous leukemia is associated with altered mitochondrial function (32).

Aggressive tumor cells have been demonstrated to use glycolysis as a predominant mode of metabolism. This observation, known as the Warburg effect, is not fully understood nor is the survival advantage conferred by glycolysis (33). However, human tumors with a low BEC, a marker of glycolytic metabolism, have a poor prognosis (22). In order to determine whether *in vivo* growth selected for this phenotype, we compared the bioenergetic index of cells prior to and after implantation. The BEC of cells from two different tumors was greatly diminished from parental SV7tert PDGF cells. Thus, it is likely that the shift to a glycolytic metabolism supplies a growth advantage *in vivo*. The precise survival advantage of the Warburg effect is not fully understood, but glycolytic cells have been shown to have increased resistance to hydrogen peroxide-induced apoptosis (34, 35). This may be of relevance to our tumors, which have persistently elevated levels of hydrogen peroxide.

Overexpression of a growth factor or its receptor is a common event in human tumorigenesis (36, 37). However, the precise role of growth factor overexpression in human tumorigenesis is not fully understood. Neoplasms known to have aberrant growth factor overexpression include multiple myeloma and melanoma, neoplasms in which p16 inactivation is a common event. Whereas blockade of growth factor expression can be accomplished by gene silencing techniques such as small interfering RNA, these techniques do not recapitulate the epigenetic changes that are required for *in vivo* growth due to continuous growth factor activation. We demonstrate for the first time autocrine transformation of human cells *in vitro*, and we demonstrate the epigenetic changes that occur in *in vivo* growth, namely silencing of p16 and increased glycolysis. Chemoprevention and treatment of these malignancies may be accomplished by therapies that decrease reactive oxygen and/or prevent transition to glycolytic metabolism.

Acknowledgments—We thank Andrea Schaffler and Mark Kieran for assistance with the PDGF radioimmunoassays.

REFERENCES

1. Betsholtz, C., Heldin, C. H., Nister, M., Ek, B., Westerman, A., and Westermark, B. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 176–182
2. Hammacher, A., Nister, M., Westerman, B., and Heldin, C. H. (1988) *Eur. J. Biochem.* **176**, 179–186
3. Doolittle, R. F., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E., Devare, S. G., Robbins, K. C., Aaronson, S. A., and Antoniades, H. N. (1983) *Science* **221**, 275–277
4. Huang, J. S., Huang, S. S., and Deuel, T. F. (1984) *In Vitro J. Tissue Cult. Assoc.* **20**, 280
5. Shimizu, A., O'Brien, K. P., Sjoblom, T., Pietras, K., Buchdunger, E., Collins, V. P., Heldin, C. H., Dumanski, J. P., and Ostman, A. (1999) *Cancer Res.* **59**, 3719–3723
6. Golub, T. R., Barker, G. F., Lovett, M., and Gilliland, D. G. (1994) *Cell* **77**, 307–316
7. Simon, M. P., Pedoutour, F., Sirvent, N., Grosgeorge, J., Minoletti, F., Coindre, J. M., Terrier-Lacombe, M. J., Mandahl, N., Craver, R. D., Blin, N., Sozzi, G., Turc-Carel, C., O'Brien, K. P., Kedra, D., Fransson, I., Guilbaud, C., and Dumanski, J. P. (1997) *Nat. Genet.* **15**, 95–98
8. Arbiser, J. L., Yeung, R., Weiss, S. W., Arbiser, Z. K., Amin, M. B., Cohen, C., Frank, D., Mahajan, S., Herron, G. S., Yang, J., Onda, H., Zhang, H. B., Bai,

- X., Uhlmann, E., Loefer, A., Northrup, H., Au, P., Davis, I., Fisher, D. E., and Gutmann, D. H. (2001) *Am. J. Pathol.* **159**, 483–491
9. Arbiser, J. L., Govindarajan, B., Bai, X., Onda, H., Kazlauskas, A., Lim, S. D., Amin, M. B., and Claesson-Welsh, L. (2002) *Am. J. Pathol.* **161**, 781–786
10. Leveen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E., and Betsholtz, C. (1994) *Genes Dev.* **8**, 1875–1887
11. Soriano, P. (1994) *Genes Dev.* **8**, 1888–1896
12. Govindarajan, B., Klatfer, R., Miller, M. S., Mansur, C., Mizesko, M., Bai, X., LaMontagne, K., Jr., and Arbiser, J. L. (2002) *Mol. Med.* **8**, 1–8
13. Enis, D. R., Bothwell, A. L., Sessa, W. C., Pober, J. S., and Schechner, J. S. (2002) *J. Invest. Dermatol.* **119**, 209
14. Chung, J., Bachelder, R. E., Lipscomb, E. A., Shaw, L. M., and Mercurio, A. M. (2002) *J. Cell Biol.* **158**, 165–174
15. Alani, R. M., Hasskarl, J., Grace, M., Hernandez, M. C., Israel, M. A., and Munger, K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 9637–9641
16. Arbiser, J. L., Flynn, E., and Barnhill, R. L. (1998) *J. Am. Acad. Dermatol.* **38**, 950–954
17. Arbiser, J. L., Petros, J., Klatfer, R., Govindarajan, B., McLaughlin, E. R., Brown, L. F., Cohen, C., Moses, M., Kilroy, S., Arnold, R. S., and Lambeth, J. D. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 715–720
18. Shaw, L. M., Rabinovitz, I., Wang, H. H. F., Toker, A., and Mercurio, A. M. (1997) *Cell* **91**, 949–960
19. Govindarajan, B., Mizesko, M. C., Miller, M. S., Onda, H., Nunnally, M., Casper, K., Brat, D., Cohen, C., and Arbiser, J. L. (2003) *Clin. Cancer Res.* **9**, 3469–3475
20. Unwin, R. D., Craven, R. A., Harnden, P., Hanrahan, S., Totty, N., Knowles, M., Eardley, I., Selby, P. J., and Banks, R. E. (2003) *Proteomics* **3**, 1620–1632
21. Racker, E. (1981) *Science* **213**, 1313
22. Cuezva, J. M., Krajewska, M., de Heredia, M. L., Krajewski, S., Santamaria, G., Kim, H., Zapata, J. M., Marusawa, H., Chamorro, M., and Reed, J. C. (2002) *Cancer Res.* **62**, 6674–6681
23. Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., and Weinberg, R. A. (1999) *Nature* **400**, 464–468
24. Arbiser, J. L., Moses, M. A., Fernandez, C. A., Ghiso, N., Cao, Y., Klauber, N., Frank, D., Brownlee, M., Flynn, E., Parangi, S., Byers, H. R., and Folkman, J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 861–866
25. McLaughlin, E. R., Brown, L. F., Weiss, S. W., Mulliken, J. B., Perez-Atayde, A., and Arbiser, J. L. (2000) *J. Invest. Dermatol.* **114**, 1209–1210
26. Klatfer, R., and Arbiser, J. L. (2000) *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **5**, 79–82
27. Govindarajan, B., Bai, X., Cohen, C., Zhong, H., Kilroy, S., Louis, G., Moses, M., and Arbiser, J. L. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 9790–9795
28. Cohen, C., Zavala-Pompa, A., Sequeira, J. H., Shoji, M., Sexton, D. G., Cotsonis, G., Cerimele, F., Govindarajan, B., Macaron, N., and Arbiser, J. L. (2002) *Clin. Cancer Res.* **8**, 3728–3733
29. Arbiser, J. L. (2004) *Semin. Cancer Biol.* **14**, 81–91
30. Alani, R. M., Young, A. Z., and Shiflett, C. B. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7812–7816
31. Jacobs, J. J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R. A., and Van Lohuizen, M. (1999) *Nature* **397**, 164–168
32. Dai, Y., Rahmani, M., Corey, S. J., Dent, P., and Grant, S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 34227–34239
33. Racker, E., and Spector, M. (1981) *Science* **213**, 303–307
34. Le Goffe, C., Vallette, G., Charrier, L., Candelon, T., Bou-Hanna, C., Bouhours, J. F., and Labois, C. L. (2002) *Biochem. J.* **364**, 349–359
35. Elstrom, R. L., Bauer, D. E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M. H., Plas, D. R., Zhuang, H. M., Cinalli, R. M., Alavi, A., Rudin, C. M., and Thompson, C. B. (2004) *Cancer Res.* **64**, 3892–3899
36. Becker, D., Lee, P. L., Rodeck, U., and Herlyn, M. (1992) *Oncogene* **7**, 2303–2313
37. Shepard, H. M., Lewis, G. D., Sarup, J. C., Fendly, B. M., Maneval, D., Mordenti, J., Figari, I., Kotts, C. E., Palladino, M. A., Ullrich, A., and Slamon, D. (1991) *J. Clin. Immunol.* **11**, 117–127
38. Arbiser, J. L., Fan, C. Y., Su, X., Van Emburgh, B. O., Cerimele, F., Miller, M. S., Harvell, J., and Marinkovich, M. P. (2004) *J. Invest. Dermatol.* **123**, 788–790

Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase

Gema Santamaría^{1,†}, Marta Martínez-Díez^{1,†}, Isabel Fabregat² and José M.Cuezva^{1,*}

¹Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain and

²IDIBELL-Institut de Recerca Oncològica, 08907 L'Hospitalet, Barcelona, Spain

*To whom correspondence should be addressed at: Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain. Tel: 34 91 497 4866; Fax: 34 91 497 4799; Email: jmcuezva@cbm.uam.es

There is a large body of clinical data documenting that most human carcinomas contain reduced levels of the catalytic subunit of the mitochondrial H⁺-ATP synthase. In colon and lung cancer this alteration correlates with a poor patient prognosis. Furthermore, recent findings in colon cancer cells indicate that downregulation of the H⁺-ATP synthase is linked to the resistance of the cells to chemotherapy. However, the mechanism by which the H⁺-ATP synthase participates in cancer progression is unknown. In this work, we show that inhibitors of the H⁺-ATP synthase delay staurosporine (STS)-induced cell death in liver cells that are dependent on oxidative phosphorylation for energy provision whereas it has no effect on glycolytic cells. Efficient execution of cell death requires the generation of reactive oxygen species (ROS) controlled by the activity of the H⁺-ATP synthase in a process that is concurrent with the rapid disorganization of the cellular mitochondrial network. The generation of ROS after STS treatment is highly dependent on the mitochondrial membrane potential and most likely caused by reverse electron flow to Complex I. The generated ROS promote the carbonylation and covalent modification of cellular and mitochondrial proteins. Inhibition of the activity of the H⁺-ATP synthase blunted ROS production prevented the oxidation of cellular proteins and the modification of mitochondrial proteins delaying the release of cytochrome *c* and the execution of cell death. The results in this work establish the downregulation of the H⁺-ATP synthase, and thus of oxidative phosphorylation, as part of the molecular strategy adapted by cancer cells to avoid ROS-mediated cell death. Furthermore, the results provide a mechanistic explanation to understand chemotherapeutic resistance of cancer cells that rely on glycolysis as the main energy provision pathway.

Introduction

Mitochondria play a central role in the physiology of higher eukaryotic cells. Genetic and/or epigenetic alterations that impact on mitochondrial functions are thus involved in the development of a vast array of human pathologies (1). The provision of metabolic energy by oxidative phosphorylation (2) and the execution of cell death (3–6) are two cellular functions of mitochondria involved in the progression of human diseases. However, recent findings indicate the molecular and function integration of cellular metabolism with apoptosis (7–10). In this regard, the requirement of oxidative phosphorylation for efficient execution of cell death is a matter of debate. For instance, some authors have suggested that cells devoid of mitochondrial DNA (ρ⁰), which are unable to carry on oxidative phosphorylation, undergo apoptosis as efficiently as their parental ρ⁺ cells (11–13) whereas other authors suggested the opposite, i.e. the ρ⁰ cells have a resistant apoptotic phenotype (14–16). Contributing to the same debate it has been reported that oligomycin (OL), a specific inhibitor of the H⁺-ATP synthase, is a promoter (17,18) or an inhibitor (19,20) of apoptosis. In addition, the activity of oxidative phosphorylation has been shown to be required for Bax-induced toxicity in yeast cells (21). Indeed, genetic screens in yeast, aimed at the identification of genes that could confer a Bax-resistance phenotype, allowed the identification of a subunit of the mitochondrial H⁺-ATP synthase critical for Bax-mediated killing of *Saccharomyces cerevisiae* (19). Moreover, Bax-mediated killing of the budding yeast has been shown to be strictly dependent upon select mitochondrial components such as the nuclear encoded β-subunit of the H⁺-ATP synthase and mitochondrial genome-encoded proteins (22). More recently, a specific repression of the expression of the β-subunit of the H⁺-ATP synthase has been documented in rat hepatocarcinomas (23) as well as in the tumor biopsies of liver, colon, kidney, lung, breast, gastric and esophageal cancer patients (24–26). These findings have been recently confirmed (27–29) and extended to other carcinomas (30). Remarkably, the expression level of the β-subunit of the H⁺-ATP synthase in lung (26) and colon (24) cancer significantly correlated with the prognosis of the patients. Moreover, recent findings indicate that resistance to 5-fluorouracil treatment is linked to the downregulation of the H⁺-ATP synthase in colon cancer cells (31). Reasoning that there are enough indications for the participation of the H⁺-ATP synthase in the execution of cell death and in cancer progression, we undertook the following approach designed to characterize the mechanistic contribution of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in staurosporine (STS)-triggered cell death in liver cells. The results presented support that the activity of the H⁺-ATP synthase and, thus, the dependence on oxidative phosphorylation for cellular ATP provision defines the susceptibility of a cell to execute reactive oxygen species (ROS)-dependent cell death by the mitochondrial geared pathway.

Abbreviations: AIF, apoptosis inducing factor; Endo G, endonuclease G; FCCP, carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxy-phenylhydrazone; OL, oligomycin; PCD, programmed cell death; PDTC, pyrrolidine dithiocarbamate; pI, isoelectric point; ROS, reactive oxygen species; STS, staurosporine.

[†]These authors contributed equally to this work.

Materials and methods

Cell cultures and cell recovery

Rat liver clone 9 (C9) (32) and rat hepatoma AS30D and FAO cells (23) were grown as described previously. The C9 and FAO cells were recovered from the plates by trypsin treatment except for those needed for the analysis of caspase 3 activities in which case they were scraped off in PBS. For all the assays AS30D cells were recovered by centrifugation.

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and mitochondrial mass

The fluorescent TMRM⁺ and NAO probes (Molecular Probes, Eugene, Oregon) were used to analyze $\Delta\Psi_m$ (33) and mitochondrial mass by flow cytometry, respectively. Different concentrations of carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxy-phenylhydrazone (FCCP) (0–5 μ M) were used to titrate $\Delta\Psi_m$. The cellular fluorescence intensity was measured using a FACScan flow cytometer (Becton–Dickinson, San José, CA). For each analysis 10 000 events were recorded.

Determination of caspase 3 activity

After various treatments the cells were harvested and lysed at 4°C in 5 mM Tris/HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA and 0.5% Triton X-100. For the determination of caspase 3 activities the fluorescent caspase 3 substrate Ac-DEVD-AMC was used (34). Fluorescence was measured in a Microplate Fluorescence Reader FL600 Luminiscence Spectrophotometer (PerkinElmer LS-50) ($\lambda_{\text{excitation}}$, 380 nm; $\lambda_{\text{emission}}$, 440 nm). Protein concentration in the cellular lysates was determined using the Bio-Rad protein assay kit.

Protein electrophoresis and western blot analysis

The cells were resuspended in a lysis buffer containing 25 mM Hepes, 2.5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 1 mM PMSF and 5 μ g/ml leupeptin. Cellular proteins were fractionated on SDS–12% PAGE and then transferred onto PVDF membranes (23). The primary monoclonal antibodies used were: anti-caspase 9 antibody (NeoMarkers, 1:1000), anti-green fluorescent protein (anti-GFP) antibody (Clontech, 1:1000) and anti- α -tubulin antibody (Sigma, 1:1000). The primary polyclonal antibodies used were: anti-caspase 3 antibody (D157, Cell Signaling, 1:500), anti-endonuclease G (anti-Endo G) antibody (ψ ProSci Incorporated, 2 μ g/ml), anti-apoptosis inducing factor (anti-AIF) antibody (Oncogene, 2.5 μ g/ml), anti-Bax antibody (Santa Cruz, 1:1000), anti-Bcl-X_L antibody (Santa Cruz, 1:1000) and anti- β -F1-ATPase antibody (24). Peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgGs (Nordic Immunology, 1:3000) were used as secondary antibodies. The blots were revealed using the luminol electrochemiluminescence (ECL[®]) reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK).

Nuclear DNA staining

Control and treated C9 cells growing on coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and further permeabilized with methanol. Cell nuclei were stained using a 300 nM solution of 4,6-diamidino-2-phenylindole (Sigma). Coverslips were observed in a Leica DMIRB fluorescence microscope ($\lambda_{\text{excitation}}$, 358 nm; $\lambda_{\text{emission}}$, 461 nm). The percentage of fragmented nuclei was counted in twenty different fields per condition assayed.

Analysis of the cell cycle and nuclear DNA content by flow cytometry

The cells were treated as indicated, harvested and fixed in 70% ice-cold ethanol for at least 12 h at 4°C. Afterwards, cells were treated with RNase (100 μ g/ml) for 30 min at 37°C. The ploidy determination of the cells was estimated by flow cytometric analysis after staining of DNA with propidium iodide. The DNA content per cell was then evaluated in a FACScan. For computer analysis only the signals from single cells were considered (10 000 cells/assay).

Determination of ATP

Approximately 2×10^6 cells were precipitated and extracted with 100 μ l of a 6% perchloric acid solution. After centrifugation at 15 000 *g*, to remove cell debris, the resulting supernatants were neutralized with 2% KOH. The determination of the cellular concentration of ATP was carried out by standard enzymatic procedures.

Determination of mitochondrial width

The distribution and morphology of mitochondria in cells exposed to different conditions was analyzed in C9 cells stably expressing a variant of gfp (32) that is localized in the matrix of the organelle (Martínez-Díez *et al.*, to be described elsewhere) using a Leica DMIRB fluorescence microscope equipped with a GFP excitation filter (Leica, Switzerland; BP 470/40). The mitochondrial transversal section (width) is the most constant dimension of the organelle and variations on this parameter reflect an alteration of the morphology of mitochondria. The determination of the mitochondrial width was carried out in digital images acquired at $\times 60$ magnification with a Leica DC100 camera. For

processing of digital images the Leica QWin software package was used (32). For every condition tested, the width of 100–200 mitochondria in at least 100 different cells was determined.

Immunofluorescence/confocal microscopy

Fluorescence and indirect immunofluorescence microscopy was performed on mitochondria-tagged gfp C9 cells after various treatments. Cells grown on coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Afterwards, the coverslips were treated with a solution containing 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min to permeabilize the cells. Coverslips were then blocked in a PBS solution containing 0.1% Triton X-100 and 1% fetal calf serum for 10 min. Coverslips were incubated with mouse monoclonal anti-cytochrome *c* antibody (PharMigen, 1:200). After three PBS rinses, the cells were incubated for 45 min in the dark with a 1:1000 dilution of goat anti-rabbit or goat anti-mouse IgGs conjugated to Alexa 594. Nuclei were stained with the label ToPro3 (Molecular Probes). Cellular fluorescence was analyzed by confocal microscopy using a Bio-rad Radiance 2000 Zeiss Axiovert S100TV using the following excitation/emission wave lengths: green (498/516 nm), red (590/617 nm) and blue (642/661 nm). In another set of experiments, C9 cells treated as indicated were incubated with 1 μ M acridine orange for 10 min at 37°C. Afterwards, the cells were washed twice with PBS and the fluorescence emission of the probe analyzed in a Leica DMIRB fluorescence microscope.

Determination of reactive oxygen species

The analysis of intracellular H₂O₂ production was performed using two different oxidation-sensitive probes, DCFH₂-DA and C-2938 (Molecular Probes, Eugene, Oregon) and methodologies. For DCFH₂-DA staining by fluorimetry we proceeded as described (34). For C-2938 staining, approximately 5×10^5 cells were resuspended in 300 μ l of PBS and incubated 30 min at 37°C with 5 μ M C-2938. Propidium iodide (1 μ g/ml) was used to detect dead cells that were excluded from the analysis. Cells were analyzed in a FACScan. For each analysis 10 000 events were recorded.

Detection of protein carbonylation

The Oxyblot Oxidized Protein Detection kit (Chemicon International) was used to detect protein oxidation of cellular proteins after various treatments. Dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivatization was carried out as indicated by the supplier on 20 μ g of cellular protein. Protein samples were fractionated on SDS–12% PAGE and processed for western blotting. The antibodies used were rabbit anti-DNPH (1:150) and goat anti-rabbit IgGs (1:300). The blots were revealed using the ECL[®] reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK).

Two-dimensional (2D) gel electrophoresis

Analytical 2D gel electrophoresis was performed to fractionate mitochondria-tagged gfp C9 cellular proteins using the immobiline DryStrip Kit (Pharmacia-LKB). Briefly, gels were rehydrated in a solution containing 8 M urea, 0.5% (v/v) Triton X-100, 1.3 mM dithiothreitol and 0.005% (v/v) Pharmalyte 3–10. The first dimension separation (IEF) was performed in 110 \times 3 mm polyacrylamide gels containing an immobilized pH 3–10 gradient, at 300 V for 1 h and 1400 V for 17 h at a constant temperature of 20°C. The second-dimension separation (SDS) was in 12.5% polyacrylamide gels (14 \times 13 cm) at room temperature overnight. Equal amounts of protein (175 μ g) derived from freeze-dried cellular extracts were resuspended in the rehydration solution and applied to the strips. After electrophoresis, the gels were either stained or processed for western blotting.

Online supplementary material

For live imaging presented in the supplementary video, mitochondria-tagged gfp C9 cells were grown on glass plates and live images in a Cell Observer Zeiss equipment were taken using a Zeiss Axiovert 200 inverted microscope with a Coolsnap FX CCD camera (Roper Scientific). Images were taken every 3 min for 30 frames with a $\times 40$ objective and a gfp filter. The Metamorph 6.1r6 (Universal Imaging) program was used for image processing.

Results

The activity of the H⁺-ATP synthase is required for efficient execution of cell death in C9 liver cells

Consistent with previous findings (19,20,35) we observed that 3 h pre-incubation of C9 cells with OL significantly delayed the cell-death response to STS as assessed both by the analysis of cell nuclei morphology (Figure 1A) and intracellular DNA content (Figure 1B). However, at 24 h after STS treatment the rates of cell death were not significantly affected in the cells

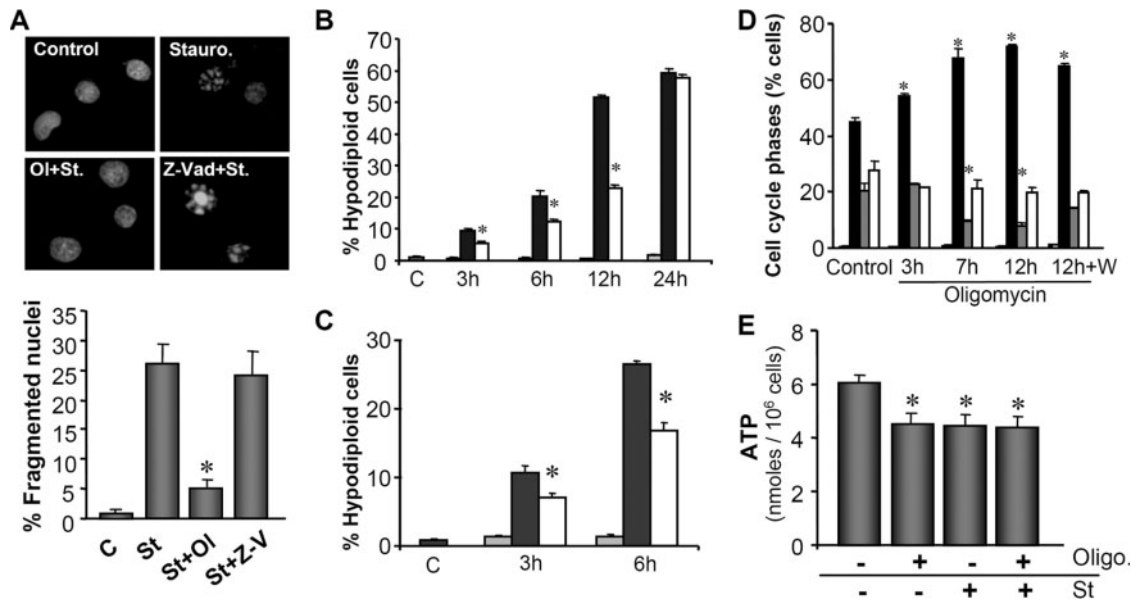


Fig. 1. Oligomycin delays STS-mediated cell death. C9 cells were treated as indicated. 1 μ M STS (St), 6 μ M OL (Ol), 20 μ M z-VAD.fmk (Z-V) and 20 μ M aurovertin B (Av) were used. (A) Assessment of nuclear DNA fragmentation by fluorescence microscopy at $\times 100$ magnification and quantification of fragmented nuclei at 6 h after initiation of STS treatment. The results shown are the means \pm SEM of four experiments. * P < 0.05 when compared with STS-treated cells. (B) FACS analysis of the percentage of hypodiploid cells at various times after STS treatment. Gray bars, OL; closed bars, STS; and open bars, OL + STS. The results shown are the means \pm SEM of five experiments. * P < 0.05 when compared with STS-treated cells. (C) FACS analysis of the percentage of hypodiploid cells after treatment with aurovertin B. Gray bars, Av; closed bars, STS; and open bars, Av + STS. The results shown are the means \pm SEM of six experiments. * P < 0.05 when compared with STS-treated cells. (D) Cells were treated with OL for the indicated times and the percentage of cells in each of the cell cycle phases determined by flow cytometric analysis. In 12 h + W, cells were treated with OL for 12 h and maintained for additional 3 h in the absence of the drug before proceeding to the analysis of the cell cycle. (Closed bars, G_0/G_1 ; gray bars, S; and open bars, G_2/M .) The results shown are the means \pm SEM of three experiments. * P < 0.05 when compared with non-treated cells. (E) Determination of cellular ATP content. The results shown are the means \pm SEM of four experiments. * P < 0.05 when compared with non-treated cells.

treated with OL (Figure 1B). At short term, OL treatment was a stronger repressor of cell death than the caspase inhibitor z-Vad.fmk (Figure 1A). To confirm the specific role of the H^+ -ATP synthase in the execution of cell death aurovertin B, a different inhibitor of the mitochondrial enzyme, was used. The results obtained revealed essentially the same findings as those obtained with OL (Figure 1C).

Liver C9 cells treated with OL were arrested at the G_0/G_1 phase of the cell cycle (Figure 1D) with significant reduction of cells in S-phase and accumulation of cells at G_0/G_1 as treatment with the drug persisted (Figure 1D). OL *per se* did not promote the induction of cell death in this cell line even after 12 h of treatment (Figure 1B and D). Removal of OL from the culture medium allowed the re-establishment of cell proliferation (Figure 1D). These results suggest that ATP produced by oxidative phosphorylation is required to enter into the S-phase of the cell cycle. Consistent with this finding, we observed that inhibition of the H^+ -ATP synthase by OL promoted a significant $\sim 25\%$ reduction in the cellular concentration of ATP (Figure 1E). However, the cellular concentration of ATP in OL-treated cells was not significantly different from that of cells treated with STS or with the combination of both drugs (Figure 1E).

Inhibition of other cellular ATPases enhanced STS-induced cell death

To exclude possible side effects of OL on other cellular ATPases we studied its effect on the subcellular compartmentalization and fluorescence emission of acridine orange. In normal cells, this fluorophore is trapped within acidic cellular granules (Figure 2). OL did not affect the subcellular

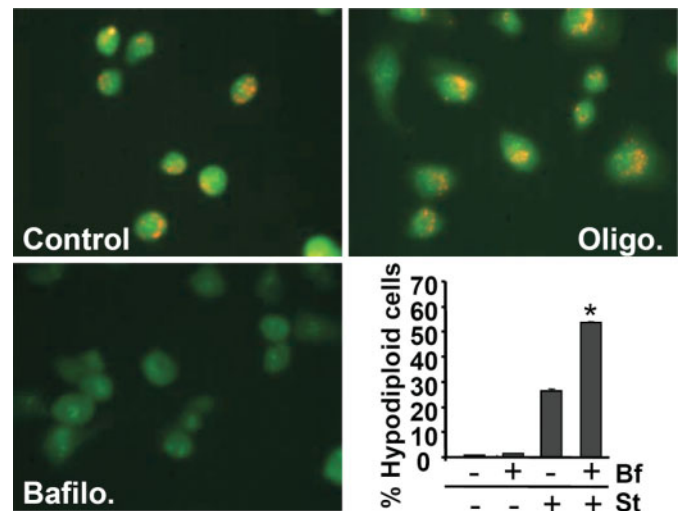


Fig. 2. Inhibition of other cellular ATPases enhanced STS-mediated cell death. C9 cells were treated as indicated. 1 μ M STS (St), 6 μ M OL (Oligo.) and 50 nM bafilomycin B1 (Bafilo/Bf) were used. C9 cells incubated with 1 μ M acridine orange visualized by fluorescence microscopy. Cells are shown at $\times 40$ magnification. The results illustrate the lack of effect of OL on other cellular ATPases. The histogram shows the FACS analysis of hypodiploid cells. Inhibition of non-mitochondrial ATPases by bafilomycin significantly increased STS-triggered cell death. The results shown are the means \pm SEM of four experiments. * P < 0.05 when compared with STS-treated cells.

distribution and fluorescence emission of acridine orange in C9 cells (Figure 2), suggesting the lack of effect of the inhibitor of the mitochondrial H^+ -ATP synthase on the activity of other cellular ATPases. In contrast, bafilomycin B1, an

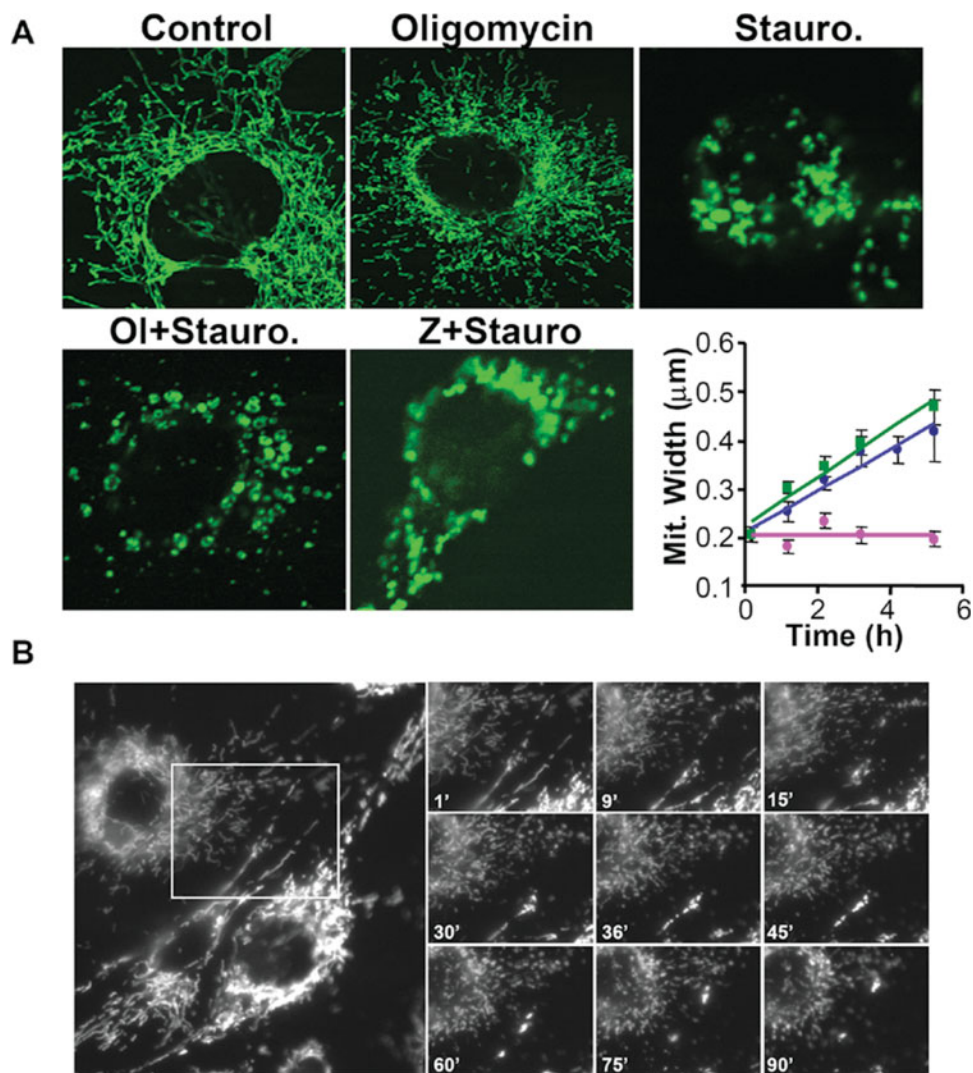


Fig. 3. Changes in cellular mitochondrial morphology after STS treatment are not influenced by OL. Mitochondria-tagged gfp C9 cells were treated as indicated and visualized by fluorescence microscopy. Aliquots of 1 μM STS (Stauro.), 6 μM OL (Ol.) and 20 μM z-VAD.fmk (Z) were used for treatments. (A) Typical cellular morphologies are shown for each condition at $\times 60$ magnification. The plot shows the time-course changes in mitochondrial width recorded in OL (pink), STS (blue) and OL + STS (green) treated cells. The results shown are the means \pm SEM of 100–200 determinations in at least 50 different cells. (B) Different time-frames of the movie (see supporting video 1) illustrate the rapid STS-induced changes on the mitochondrial network. Note that within the first 15 min thread-like mitochondria fission and are disorganized. Afterwards, fragmented mitochondria fusion into larger size organelles and move towards the nucleus.

inhibitor of cellular ATPases unrelated to the mitochondrial H^+ -ATP synthase (36), promoted the loss of the red emission signal of acridine orange as a result of the alkalization of the cellular granules triggered by the inhibition of the ATPases present in these organelles (Figure 2). Moreover, and contrary to the results obtained with OL (Figure 1A and B), incubation of the cells with STS plus bafilomycin B1 promoted a high increase in cell death, to levels even higher than those obtained when the cells were incubated with STS alone (Figure 2). These results suggest that prevention of cell death by OL is unrelated to side-effects of the inhibitor of the mitochondrial H^+ -ATP synthase on other cellular ATPases.

Inhibition of H^+ -ATP synthase does not prevent the dismantling of mitochondrial reticulum after STS treatment

To visualize the possible effects of OL on mitochondrial morphology after STS treatment we used a stable C9 cell line expressing gfp in their mitochondria. Treatment of the

cells with OL did not significantly affect the distribution and morphology of mitochondria in liver C9 cells (Figure 3A). In contrast, STS treatment promoted the rapid (< 10 min) dismantling of the cellular mitochondrial network, the migration of fragmented mitochondria towards the cell nucleus and the subsequent fusion of mitochondria into larger size organelles (see video 1 in supplementary material and Figure 3A). Different time-frames of the movie illustrating the STS-mediated changes on the mitochondrial network are presented on Figure 3B. However, the effects of STS on mitochondrial morphology were not prevented by incubation of the cells with OL (Figure 3A) or with the caspase inhibitor z-Vad.fmk (Figure 3A).

Inhibition of H^+ -ATP synthase delays the release of cytochrome c from mitochondria

Determination of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) after priming the cells to death revealed an early

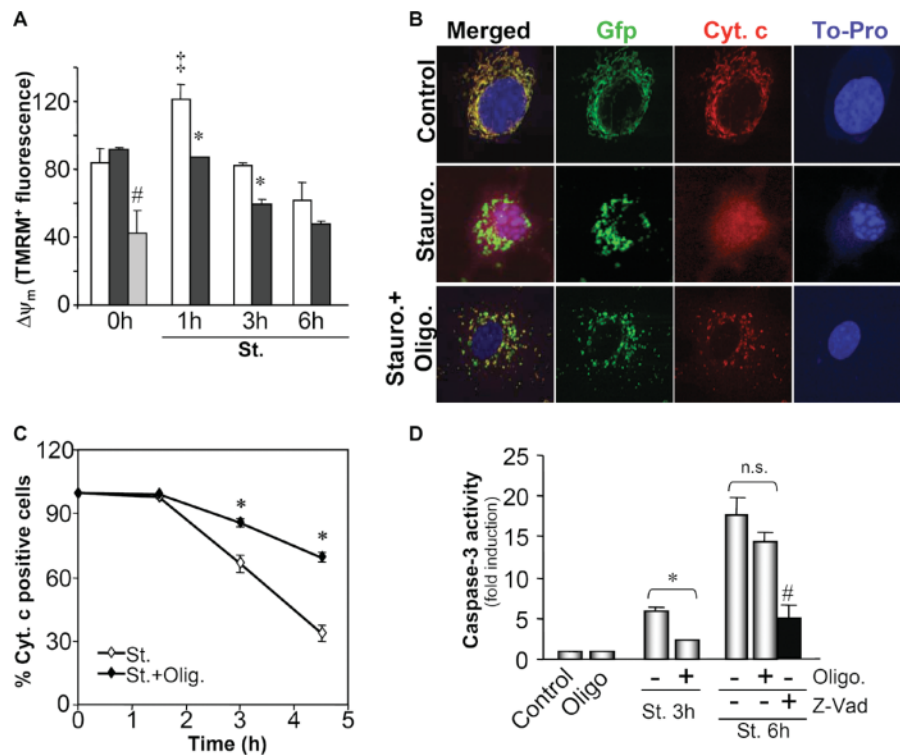


Fig. 4. The release of cytochrome *c* and activation of caspase 3 is delayed in OL-treated cells. Mitochondria-tagged gfp C9 cells were treated as indicated with none (Control) or 1 μ M STS in the absence (Stauro.) or presence of 6 μ M OL (Stauro. + Oligo.). (A) FACS determination of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in STS (open bars) and STS + OL (closed bars) treated cells. $\Delta\Psi_m$ was also assessed in C9 cells treated for 30 min with 50 μ M of the mitochondrial uncoupler FCCP (Gray bar). The results shown are the means \pm SEM of four to six experiments. * P < 0.05 when compared with STS-treated cells. ‡ and #, P < 0.05 when compared with 0 h non-treated cells. (B and C) At various times after initiation of the STS treatment the cells were analyzed by immunofluorescence microscopy using anti-cytochrome *c* antibody. Nuclear DNA was stained with To-Pro. Typical morphologies of the cells at 3 h after STS-treatment are shown (B) for each condition at $\times 60$ magnification. Quantification of the percentage of cytochrome *c* positive cells (C). The results are the means \pm SEM of three experiments. * P < 0.05 when compared with STS-treated cells. (D) Time course of the effect of OL on the activation of caspase 3 activity and inhibition of caspase 3 activation after 1 h pre-incubation of C9 cells with 20 μ M z-Vad.fmk (closed bar). The results shown are the means \pm SEM of four experiments. * and #, P < 0.05 when compared with 3 or 6 h STS-treated cells, respectively.

(1 h) increase in TMRM⁺ fluorescence in STS treated cells (Figure 4A). Contrary to this finding, we observed no significant changes in NAO fluorescence after STS treatment of the cells (data not shown). The increase in TMRM⁺ fluorescence triggered by STS was obliterated in the presence of OL (Figure 4A). Thereafter, $\Delta\Psi_m$ declined in both STS and STS + OL treated cells (Figure 4A). It should be noted that using the pH sensitive BCECF-AM fluorescent probe we were unable to detect acidification of the cell cytoplasm in response to STS treatment during the early stage (first 3 h) of cell death (data not shown).

The release of cytochrome *c* from mitochondria-tagged gfp C9 liver cells was studied in response to treatment of the cells with STS and STS + OL (Figure 4B and C). Figure 4B illustrates the STS-induced morphological changes on mitochondria, the release of cytochrome *c* and the fragmentation of nuclear DNA in C9 cells treated with STS for 3 h. Treatment of the cells with OL was unable to prevent the changes on mitochondrial morphology but prevented STS-induced nuclear DNA fragmentation (Figure 4B, 1A and B) and significantly affected the release of cytochrome *c* from mitochondria (Figure 4B and C). In agreement with this last observation we noted that the activation of caspase 3 in response to STS treatment was significantly delayed in the presence of OL (Figure 4D) although this effect was not significant at longer times of incubation (Figure 4D). The mitochondrial release of

cytochrome *c* was initiated after 90 min incubation of the cells with STS (Figure 4C), a time when morphological changes on the mitochondrial network had already occurred (Figure 3B and movie 1 in supplementary material). It should be noted that inhibition of the mitochondrial permeability transition pore with CsA did not prevent the release of cytochrome *c* from mitochondria and the induction of cell death after STS treatment (data not shown).

The H⁺-ATP synthase controls the production of ROS after STS treatment

STS treatment of liver cells promoted a rapid (maximum production at ~ 90 min) and significant increase in the production of H₂O₂ as assessed by two different methods and fluorescent probes (Figure 5A and B). Incubation of liver cells with rotenone, an inhibitor of Site I of the respiratory chain, blocked the STS-mediated increase in H₂O₂ production (Figure 5A). Interestingly, OL also abolished the STS-mediated increase in ROS production (Figure 5A and B). Consistent with a role for the generated ROS in signaling the execution of cell death we observed that STS-mediated cell death was also significantly reduced in rotenone-treated C9 cells ($\sim 50\%$, P < 0.005, data not shown). Moreover, titration of $\Delta\Psi_m$ with increasing concentrations of FCCP indicated a dose-dependent reduction of H₂O₂ production as $\Delta\Psi_m$ declines (Figure 5C).

Limiting ROS availability after STS treatment delays the release of cytochrome *c* from mitochondria and the execution of cell death

To establish a link between mitochondrial ROS production and the execution of cell death the effects of two antioxidants were studied. α -Tocopherol is not able to quench mitochondrial ROS production and consistently it did not prevent ROS production and cell death triggered by STS (data not shown). In contrast, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), a well characterized antioxidant in liver cells, partially quenched ROS production after STS treatment (Figure 5D) and blunted the STS-mediated cell death in C9 cells (Figure 5E). Moreover, a significant delay in the release of cytochrome *c* was observed in PDTC-treated cells after STS treatment (Figure 5F). Consistent with this finding, we observed that PDTC treatment arrested the STS-induced activation of caspase 3 (Figure 5G).

The H^+ -ATP synthase controls the extent of oxidative modification of cellular proteins

One of the cellular targets of the toxic oxygen radicals is the covalent modification of proteins. Treatment of the cells with STS promoted a significant increase in the carbonylation of some cellular proteins (Figure 6A). Remarkably, incubation of the cells with OL prevented the STS-triggered oxidation of the proteins (Figure 6A). Likewise, the covalent modification of proteins could be tracked by changes in their isoelectric point (pI), as revealed by fractionation of cellular proteins on 2D-gels. Analysis of AIF in liver C9 cells treated with STS revealed that a large fraction of the protein experienced a significant acidic shift in its pI when compared with non-treated C9 cells (Figure 6B). Similar findings were obtained for Endo G (Figure 6B). OL treatment prevented the STS-mediated shift in the pI of AIF and Endo G (Figure 6B). It should be noted that the covalent modification of mitochondrial proteins after STS treatment is non-selective because it also affected the ectopically expressed gfp, an effect that was also partially prevented by OL (note the tailing in pI of the acidic form of gfp in Figure 6B). However, and in the specific case of gfp, OL *per se* also affected the pI of the expressed protein (see the basic gfp form in Figure 6B), suggesting the participation of additional factors in the modification of this protein.

The cellular dependence on oxidative phosphorylation determines the contribution of the H^+ -ATP synthase to the execution of cell death. We next studied the contribution of the mitochondrial H^+ -ATP synthase in the cell death response to STS in two hepatoma cell lines, FAO and AS30D, that differ substantially in their energetic phenotype [(23) and see references therein]. The FAO hepatoma has a differentiated phenotype qualitatively resembling that of the normal hepatocyte whereas the AS30D hepatoma has a poorly differentiated phenotype. Incubation of AS30D cells with OL did not affect the cellular concentration of ATP (Figure 7A), a finding that is consistent with the lack of dependence on oxidative phosphorylation for energy provision in this highly glycolytic cell line. Likewise, STS or the combination of STS plus OL treatment to AS30D cells did not affect the cellular concentration of ATP (Figure 7A). Analysis of cell death response to STS treatment in AS30D cells revealed that this hepatoma is highly resistant to the death stimulus because we observed no increase in the number of dying cells after 6 h treatment with the drug (data not shown). In agreement with the negligible contribution of the bioenergetic function of mitochondria to cellular energy

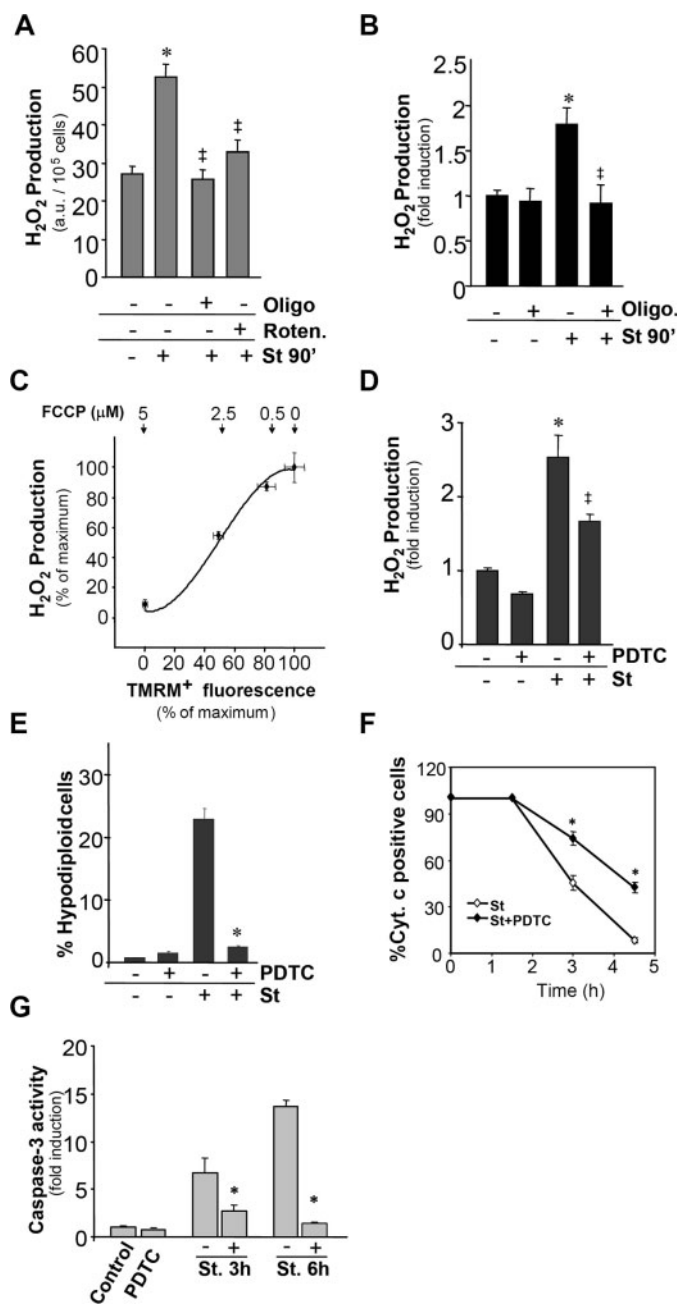


Fig. 5. The activity of the H^+ -ATP synthase controls the generation of ROS after STS treatment. Liver C9 cells and/or mitochondria-tagged gfp C9 cells were treated as indicated. 1 μ M STS (St), 6 μ M OL (Oligo.), 2 μ M rotenone (Roten.) and 10 μ M pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) were used for the treatments. (A) Fluorimetric determination of the generated H_2O_2 at 90 min after initiation of the STS treatment. The results shown are the means \pm SEM of five experiments. * and †, $P < 0.05$ when compared with non-treated cells and STS-treated cells, respectively. (B–D) FACS determination of the generated H_2O_2 in OL-treated (B), FCCP (0–5 μ M) uncoupled (C) and PDTC-treated (D) cells. The results shown are the means \pm SEM of three, seven and seven experiments, respectively. * and †, $P < 0.05$ when compared with non-treated and STS-treated cells, respectively. (E) FACS analysis of hypodiploid cells in PDTC-treated cells. The results shown are the means \pm SEM of six experiments. * $P < 0.05$ when compared with STS-treated cells. (F) At various times after initiation of the STS treatment mitochondria-tagged gfp C9 cells were analyzed by immunofluorescence microscopy and the percentage of cytochrome *c* positive cells quantified. The results are the means \pm SEM of three experiments. * $P < 0.05$ when compared with STS-treated cells. (G) Time course of the effect of PDTC on the activation of caspase 3 after STS-treatment. The results shown are the means \pm SEM of four experiments. * $P < 0.05$ when compared with STS-treated cells.

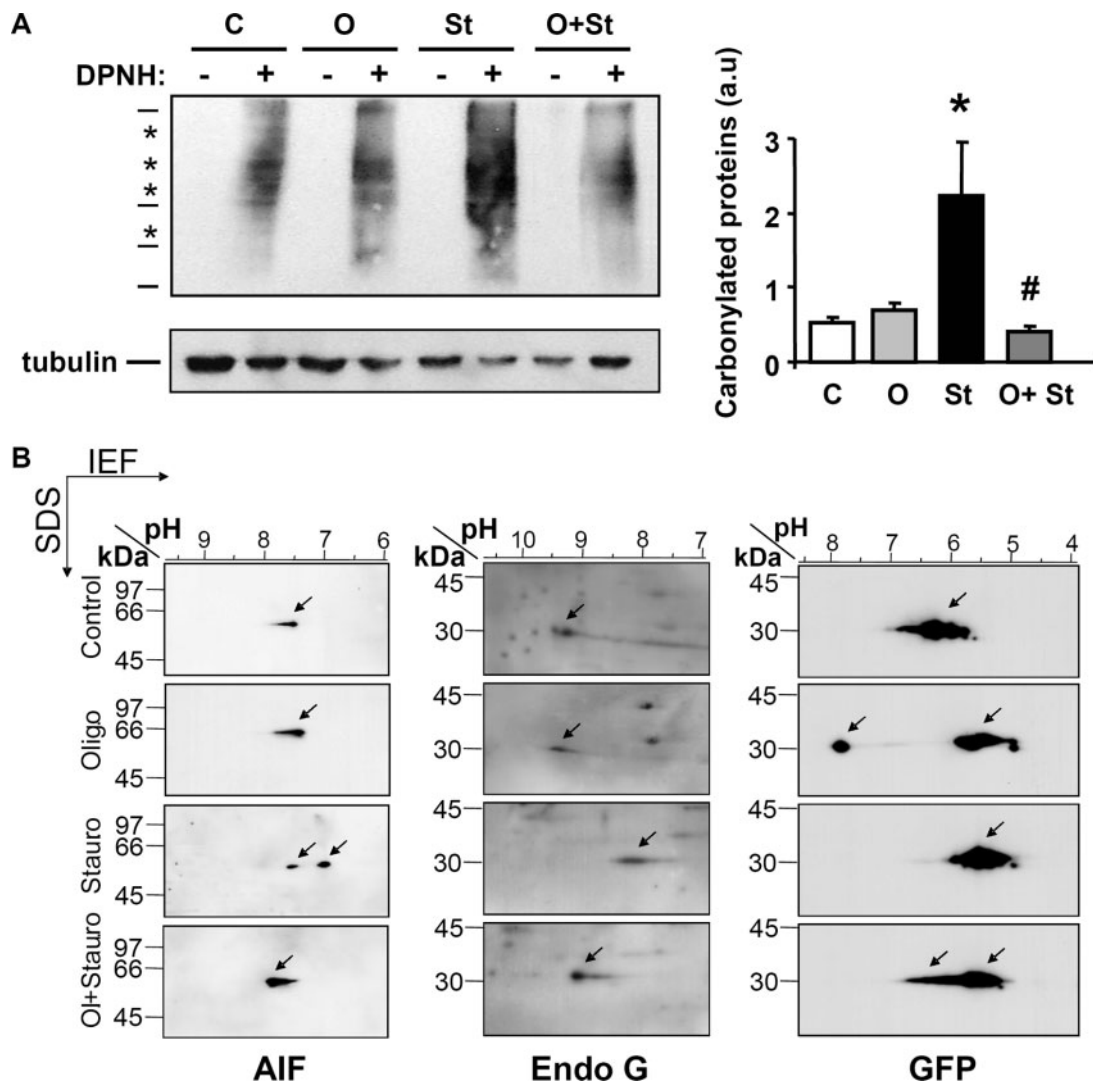


Fig. 6. The activity of the H^+ -ATP synthase controls oxidative damage of cellular proteins. (A) C9 cells were treated as previously indicated. Cellular proteins (20 μ g) were derivatized in the absence (–) or presence (+) of DPNH and processed for the identification of protein carbonyls. Protein loading of the samples was verified by western blotting with anti-tubulin antibody. Molecular mass markers (97, 66, 45 and 30 kDa) are indicated to the left. The asterisks to the left of the gel identified the four proteins used for the quantification of protein carbonylation in response to the various treatments. A representative blot of three different experiments is shown. The results shown are the means \pm SEM of three experiments. * and #, $P < 0.05$ when compared with control and STS-treated cells, respectively. (B) Mitochondria-tagged gfp C9 cells were treated as indicated. 1 μ M STS (St) and 6 μ M OL (Oligo.) were used for the treatments. Cellular proteins were fractionated after the indicated treatments on 2D-gels and AIF, Endo G and gfp visualized by western blot. Representative blots of three different experiments are shown. Arrowheads denote changes in the pI of the proteins.

provision in AS30D cells (Figure 7A), we observed no differences in ROS production after treatment of the cells with STS or with STS plus OL (Figure 7B).

In contrast, incubation of FAO cells with OL promoted a significant 3-fold decrease in the cellular content of ATP (Figure 7C), strongly suggesting that these cells largely depend on oxidative phosphorylation for cellular ATP provision. STS treatment also reduced the cellular ATP levels of FAO cells although not at a lesser extent than OL (Figure 7C). Contrary to the findings in AS30D cells, treatment of FAO cells with STS triggered the activation of cell death (Figure 7D). In agreement with the results found in C9 cells (Figure 1A and 4D), the caspase inhibitor z-Vad.fmk abrogated caspase 3 activation in FAO cells (Figure 7D), although it could only reduce partially the extent of cell death (Figure 7D). In addition, OL was as effective as z-Vad.fmk in preventing cell death in these cells (Figure 7D), indicating a relevant role for

the H^+ -ATP synthase in the execution of cell death in FAO cells. STS treatment of FAO cells also promoted a rapid (maximum production at ~ 30 min) and significant increase in H_2O_2 production (Figure 7E). It should be noted that both the relative cellular production and time scale of H_2O_2 production after STS treatment were much more intense and rapid in FAO than in C9 cells (compare Figure 7E versus 5A and B for FAO and C9, respectively). Incubation of FAO cells with rotenone also blocked STS-mediated increase in H_2O_2 production ($P < 0.05$, data not shown). Consistent with the role of the H^+ -ATP synthase in controlling the generation of ROS after STS treatment we found that OL significantly reduced H_2O_2 production in STS-treated FAO cells (Figure 7E). However, whereas in C9 cells OL completely blocked ROS production (Figure 5A and B), it was only able to reduce ROS production in FAO cells (Figure 7E), suggesting the existence of alternative pathways of ROS generation in this cell line.

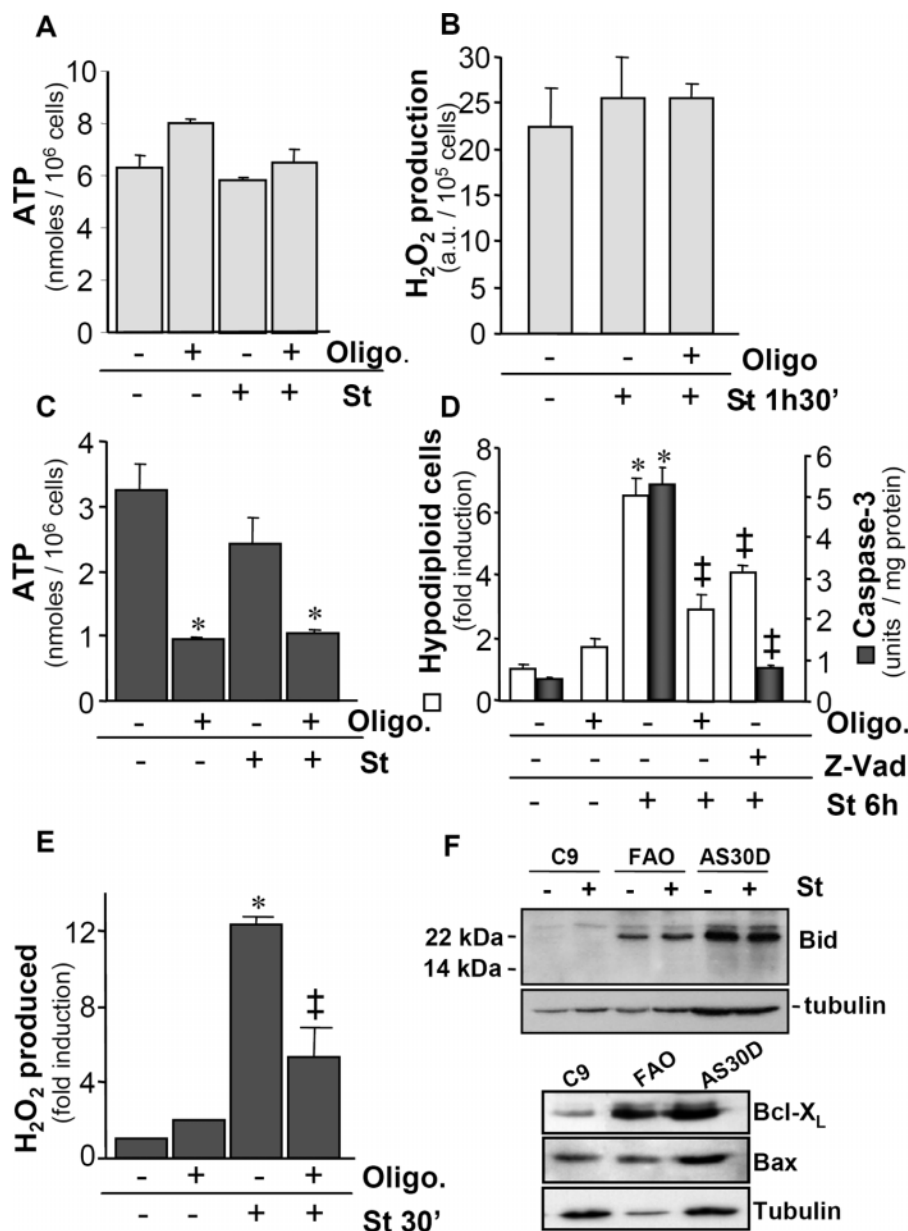


Fig. 7. Role of oxidative phosphorylation in STS-triggered cell death in hepatoma cells. AS30D and FAO hepatoma cells were treated as indicated with 1 μ M STS. 6 μ M OL was used for treatments. (A) Determination of cellular ATP content in AS30D cells after 6 h treatment with STS. The results shown are the means \pm SEM of four experiments. (B) Fluorimetric determination of the generated H₂O₂ at 90 min after initiation of the STS treatment in AS30D cells. The results shown are the means \pm SEM of three experiments. (C) Determination of cellular ATP content in FAO cells. The results shown are the means \pm SEM of four experiments. * P < 0.05 when compared with non-treated cells. (D) FACS analysis of hypodiploid cells (open bars) and determination of caspase 3 activity (closed bars) in FAO cells treated for 6 h with STS. 20 μ M z-Vad.fmk was used as indicated. The results are the means \pm SEM of three (cell death) and four (caspase 3) experiments. * and †, P < 0.05 when compared with non-treated and STS-treated cells, respectively. (E) FACS determination of the generated H₂O₂ at 30 min after initiation of the STS treatment in FAO cells. The results shown are the means \pm SEM of three experiments. * and †, P < 0.05 when compared with non-treated and STS-treated cells, respectively. (F) Proteins from C9, FAO and AS30D cells were fractionated by SDS-PAGE and the putative processing of Bid analyzed by western blot after 6 h treatment with STS. The cellular expression of Bcl-X_L and Bax were also analyzed in these cells and expressed relative to the signal of tubulin.

Finally, to exclude the possibility that STS could also trigger cell death of the cell lines analyzed in this study (C9, FAO and AS30D) through the extrinsic pathway we analyzed the expression of Bid and truncated form of Bid in response to STS treatment. The results (Figure 7F) revealed an absence of Bid expression in C9 cells or of Bid processing in FAO and AS30D cells, suggesting that the cell death response to STS treatment in the C9 and FAO cells is primarily executed via the mitochondrial pathway. In addition, the relative cellular expression of Bax and Bcl-X_L were analyzed in C9, FAO

and AS30D cells (Bcl-2 is not expressed in these cell lines). The results showed that the apoptotic potential of these cells, as assessed by the ratio of the pro-apoptotic Bax to the anti-apoptotic Bcl-X_L, was 4-fold and 8-fold higher in C9 cells than in FAO and AS30D cells, respectively (Figure 7F).

Discussion

Cells can engage in several programmed cell death (PCD) pathways in response to a death stimulus (6). In this study,

we have analyzed the cell death response to STS in liver cells that have a differential dependence on oxidative phosphorylation for cellular energy provision. The results indicate that the cell death response to STS differs significantly depending upon the relative activity of the mitochondrial pathway for the provision of metabolic energy. It appears that the H^+ -ATP synthase is a key component of PCD because its activity is involved in the generation of ROS, a death signal that is generated in the early induction phase of PCD that is required for efficient execution of cell death (6,37,38). The generated ROS are further responsible for the oxidation and covalent modification of mitochondrial constituents facilitating in this way the release of apoptogenic molecules from the mitochondria that will effectively swamp the cells into death. Within this scenario, the cell death response triggered by STS in STS-sensitive liver cells has features of PCD executed both by apoptosis and caspase-independent cell death pathways, being the activity of the H^+ -ATP synthase required in both pathways. It is unlikely that necrosis, triggered by ATP depletion of the cell, plays a role in STS-induced cell death in FAO and C9 cells. In fact, OL treatment induced a reduction in cellular ATP concentrations even larger (FAO cells) or at least similar (C9 cells) to that observed in STS-treated cells. However, in both cell lines OL treatment prevented cell death. These results are in agreement with a similar recent observation in MOLT-3 cells (39).

Molecular constituents that are involved in the regulation of the morphology of mitochondria play an important role in controlling the execution of cell death (40–42), although it appears that the contribution of such changes during apoptosis could depend on the nature of the death-inducing signal (43). A very early event after STS treatment is the dismantling of the cellular mitochondrial reticulum into punctiform organelles. We show here that OL is unable to prevent the alteration of the cellular mitochondrial reticulum after STS treatment. However, OL effectively delays the release of cytochrome *c* and the execution of cell death in response to STS, suggesting that the dismantling of the mitochondrial network is not sufficient to commit the cells to death and that the H^+ -ATP synthase participates in the regulation of PCD downstream this event.

As previously shown by others (35,44), we observed that STS promoted an early increase in TMRM⁺ retention in the mitochondria consistent with an increase in $\Delta\Psi_m$ brought about by the inhibition of cellular respiration (45). Increased TMRM⁺ retention may be due to a true increase in $\Delta\Psi_m$ or to the apparent increase in mitochondrial volume that occurs early after STS addition (see Figure 3A). The findings that NAO fluorescence did not reveal significant changes after STS treatment (data not shown) and that OL + STS treatment to the cells caused similar changes on mitochondrial morphology to that of STS alone (see Figure 3A) but abrogated the increase in TMRM⁺ retention (see Figure 4A) indicate a true increase in $\Delta\Psi_m$ after STS treatment. It has been described that upon inhibition of mitochondrial respiration ATP generated by glycolysis supports $\Delta\Psi_m$ (35,46–48). In this situation, the H^+ -ATP synthase is forced to hydrolyze ATP generating matrix ADP^{3-} that would be exchanged with cytosolic ATP^{4-} generated by glycolysis. The electrogenic exchange of the nucleotides by adenine nucleotide translocase and the ATP-supported proton pumping activity of the ATPase are both likely to contribute to the maintenance of a high $\Delta\Psi_m$ in the early phase after STS treatment (35,46–48). In fact, inhibition of the ATPase activity with OL prevented $\Delta\Psi_m$

hyperpolarization after STS treatment. It is well established that ROS production by mitochondria is highly dependent on the proton motive force (49,50). We have observed that ROS production after STS treatment was dose-dependently inhibited by titration of $\Delta\Psi_m$ with the uncoupler FCCP. Furthermore, ROS production after STS treatment was abolished in the presence of the inhibitor rotenone, consistent with ROS being produced in this situation owing to reverse transport of electrons from Complex II-linked respiratory substrates into Complex I [(50,51) and references therein]. Consistently, inhibition of the ATPase-supported high $\Delta\Psi_m$ with OL suppressed ROS production.

Our results suggest that the ATPase-supported high $\Delta\Psi_m$ induced by STS and the subsequent generation of ROS precede the release of cytochrome *c* from mitochondria. In fact, blocking the increase in $\Delta\Psi_m$ by OL treatment prevented ROS generation, attenuated cytochrome *c* release and the activation of caspase 3, delaying the execution of PCD. Likewise, quenching of the generated ROS by PDTC treatment attenuated cytochrome *c* release and the execution of cell death, although we cannot exclude that PDTC might have additional effects on caspases (52), because caspase 3 activation and DNA fragmentation are completely blocked with this treatment. These findings support that the generated ROS are not an epiphenomenon of PCD but rather a required signal (53) for the efficient execution of cell death in oxidative phosphorylation-dependent (FAO and C9) cells. It has been suggested that reverse functioning of the H^+ -ATP synthase contributes to cytoplasm acidification, as determined by changes in the fluorescence emission of a mitochondrial targeted pH-sensitive gfp probe (35). In our case, we were unable to detect significant acidification of the cytoplasm at early stages of PCD after STS treatment (data not shown). However, we did observe that mitochondrial-targeted gfp suffers ROS-mediated covalent modifications in response to STS treatment that might have affected the fluorescence spectrum of the pH-sensitive probe used in that study (35).

ROS are known to promote oxidative damage of cellular constituents (DNA, lipids and proteins) as well as alterations in the signal transduction pathways that control the expression of genes required to execute cell death (52,54). More recently, the diminished production of ROS observed in the non-cleavable p75 mutant of Complex I has also been associated with the maintenance of plasma membrane integrity and the externalization of phosphatidylserine (55). Consistent with a role for ROS in PCD, we illustrate here that the generated ROS after STS treatment promote the carbonylation of cellular proteins as well as covalent modifications of mitochondrial proteins. Remarkably, these modifications are prevented by inhibition of ROS production with OL, strongly supporting the role of the activity of the H^+ -ATP synthase in controlling the extent of oxidative modification of mitochondrial constituents. Although the results in this study illustrate the rapid ROS-mediated covalent modification of AIF and Endo G, they do not necessarily imply that such changes are required for the cell death activity of these molecules. In fact, the apoptotic activity of AIF has been shown to be independent of such changes (56). Rather, we speculate that the extent of non-specific ROS-mediated modifications of mitochondrial constituents (illustrated on the ectopically expressed gfp) could represent a critical point of regulation of the mitochondria-gear PCD pathway because it could define the threshold value of irreversible damage of the mitochondria

and the set-point for the release of the mitochondrial arsenal that controls PCD.

Interestingly, our results indicate that the cell death response to STS differs significantly depending upon the relative contribution of mitochondrial oxidative phosphorylation to the provision of metabolic energy in the cell. In this regard, FAO, C9 and AS30D cells could, respectively, represent liver cell types that rely highly, moderately and not at all on mitochondrial oxidative phosphorylation for cellular energy provision as assessed by the effect of OL on their respective cellular ATP concentrations. While the FAO and C9 cells display a phenotype sensitive to the drug, the AS30D cells are resistant to the cell death stimulus. Consistently, the inhibition of the H⁺-ATP synthase activity by OL attenuated the execution of apoptosis in FAO and C9 cells. Overall, these findings are in agreement with previous reports that described the importance of an efficient oxidative phosphorylation for the execution of apoptosis (14–16,21,35) and with the role of the H⁺-ATP synthase in apoptotic cell death (19,20,22). Furthermore, our data suggest that the controversial findings in the literature regarding the requirement or not of oxidative phosphorylation for efficient execution of apoptosis could arise as a result of bioenergetic differences of the cellular types that have been studied. Nonetheless, it should be noted that the cell death response to STS could also be modulated by additional cellular factors. In this regard, the higher Bax/Bcl-X_L ratio found in C9 than in FAO cells might contribute to the higher total apoptosis observed in C9 cells after STS treatment.

The generation of ROS is a physiological process that depends on the cellular activity of mitochondrial respiration, determining the lifespan of cells and organisms (57). On the other hand, and perhaps unexpectedly, glycolysis, the alternative energy producing pathway of the cell, is also integrated with apoptosis (7–9). In this regard, we suggest that cells that rely heavily on glycolysis for energy production, such as the AS30D hepatoma, display an apoptotic resistant phenotype similar to ρ⁰ cells (14–16) because ROS signaling after chemotherapeutic targeting of the mitochondria is blunted. In contrast, cells that depend on oxidative phosphorylation for ATP provision experience PCD via ROS signaling. Therefore, it is not surprising that the expression of the H⁺-ATP synthase, and perhaps of other OXPHOS complexes, is downregulated in most human tumors whereas the expression of some glycolytic markers shows just the opposite trend (24–26). This situation provides the cancer cell with an advantageous bioenergetic phenotype because the potential for ROS production is diminished, oxidative damage to cellular constituents would be reduced and the threshold for PCD induction will be higher, while glycolytic metabolism could support the energetic demand that allows cellular proliferation and tumor expansion.

Supplementary material

Supplementary material can be found at: <http://www.carcin.oxfordjournals.org/>.

Acknowledgements

We thank Mulchand S.Patel (State University of New York), Jorgina Satrustegui (CBMSO) and Juan M.Zapata (The Burnham Institute) for comments and helpful discussions. We also thank Carlos Sánchez for his expert guidance and help with video experiments. Margarita Chamorro, Francisco Murillo, Blanca Herrera and Miguel Murillo are acknowledged for excellent

technical assistance. G.S. and M.M.-D. were supported by pre-doctoral fellowships from the Ministerio de Ciencia y Tecnología. This work was supported by grants from the Ministerio de Sanidad y Consumo (PI041255), Comunidad de Madrid (SAL/0026/2004) and Ministerio de Ciencia y Tecnología (BMC2001-0710). The CBMSO receives an institutional grant from Fundación Ramón Areces.

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

- Wallace,D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, **283**, 1482–1488.
- Boyer,P.D. (1997) The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 717–749.
- Ferri,K.F. and Kroemer,G. (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell. Biol.*, **3**, E255–263.
- Wang,X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, **15**, 2922–2933.
- Reed,J.C. (1999) Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr. Opin. Oncol.*, **11**, 68–75.
- Jaattela,M. (2004) Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene*, **23**, 2746–2756.
- Plas,D.R. and Thompson,C.B. (2002) Cell metabolism in the regulation of programmed cell death. *Trends Endocrinol. Metab.*, **13**, 75–78.
- Danial,N.N., Gramm,C.F., Scorrano,L. *et al.* (2003) BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*, **424**, 952–956.
- Azoulay-Zohar,H., Israelson,A., Abu-Hamad,S. and Shoshan-Barmatz,V. (2004) In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem. J.*, **377**, 347–355.
- Vahsen,N., Cande,C., Briere,J.J. *et al.* (2004) AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.*, **23**, 4679–4689.
- Jacobson,M.D., Burne,J.F., King,M.P., Miyashita,T., Reed,J.C. and Raff,M.C. (1993) Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature*, **361**, 365–369.
- Marchetti,P., Susin,S.A., Decaudin,D., Gamen,S., Castedo,M., Hirsch,T., Zamzami,N., Navai,J., Senik,A. and Kroemer,G. (1996) Apoptosis-associated derangement of mitochondrial function in cells lacking mitochondrial DNA. *Cancer Res.*, **56**, 2033–2038.
- Jiang,S., Cai,J., Wallace,D.C. and Jones,D.P. (1999) Cytochrome *c*-mediated apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. Signaling pathway involving release and caspase 3 activation is conserved. *J. Biol. Chem.*, **274**, 29905–29911.
- Dey,R. and Moraes,C.T. (2000) Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate the protective effect of Bcl-x(L) in osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem.*, **275**, 7087–7094.
- Kim,J.Y., Kim,Y.H., Chang,I., Kim,S., Pak,Y.K., Oh,B.H., Yagita,H., Jung,Y.K., Oh,Y.J. and Lee,M.S. (2002) Resistance of mitochondrial DNA-deficient cells to TRAIL: role of Bax in TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene*, **21**, 3139–3148.
- Park,S.Y., Chang,I., Kim,J.Y., Kang,S.W., Park,S.H., Singh,K. and Lee,M.S. (2004) Resistance of mitochondrial DNA-depleted cells against cell death: role of mitochondrial superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **279**, 7512–7520.
- Wolvetang,E.J., Johnson,K.L., Krauer,K., Ralph,S.J. and Linnane,A.W. (1994) Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Lett.*, **339**, 40–44.
- Peachman,K.K., Lyles,D.S. and Bass,D.A. (2001) Mitochondria in eosinophils: functional role in apoptosis but not respiration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 1717–1722.
- Matsuyama,S., Xu,Q., Velours,J. and Reed,J.C. (1998) The Mitochondrial F0F1-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol. Cell*, **1**, 327–336.
- Shchepina,L.A., Pletjushkina,O.Y., Avetisyan,A.V., Bakeeva,L.E., Fetisova,E.K., Izyumov,D.S., Saprunova,V.B., Vyssokikh,M.Y., Chernyak,B.V. and Skulachev,V.P. (2002) Oligomycin, inhibitor of the F0 part of H⁺-ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis. *Oncogene*, **21**, 8149–8157.
- Harris,M.H., Vander Heiden,M.G., Kron,S.J. and Thompson,C.B. (2000) Role of oxidative phosphorylation in Bax toxicity. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 3590–3596.
- Gross,A., Pilcher,K., Blachly-Dyson,E., Basso,E., Jockel,J., Bassik,M.C., Korsmeyer,S.J. and Forte,M. (2000) Biochemical and genetic analysis of

- the mitochondrial response of yeast to BAX and BCL-X(L). *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 3125–3136.
23. López de Heredia, M., Izquierdo, J.M. and Cuezva, J.M. (2000) A conserved mechanism for controlling the translation of beta-F1-ATPase mRNA between the fetal liver and cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **275**, 7430–7437.
 24. Cuezva, J.M., Krajewska, M., de Heredia, M.L., Krajewski, S., Santamaria, G., Kim, H., Zapata, J.M., Marusawa, H., Chamorro, M. and Reed, J.C. (2002) The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res.*, **62**, 6674–6681.
 25. Isidoro, A., Martinez, M., Fernandez, P.L., Ortega, A.D., Santamaria, G., Chamorro, M., Reed, J.C. and Cuezva, J.M. (2004) Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem. J.*, **378**, 17–20.
 26. Cuezva, J.M., Chen, G., Alonso, A.M., Isidoro, A., Misk, D.E., Hanash, S.M. and Beer, D.G. (2004) The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis*, **25**, 1157–1163.
 27. Unwin, R.D., Craven, R.A., Hamden, P., Hanrahan, S., Totty, N., Knowles, M., Eardley, I., Selby, P.J. and Banks, R.E. (2003) Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics*, **3**, 1620–1632.
 28. Meierhofer, D., Mayr, J.A., Foetschl, U., Berger, A., Fink, K., Schmeller, N., Hacker, G.W., Hauser-Kronberger, C., Kofler, B. and Sperl, W. (2004) Decrease of mitochondrial DNA content and energy metabolism in renal cell carcinomas. *Carcinogenesis*, **25**, 1005–1010.
 29. Yin, P.H., Lee, H.C., Chau, G.Y., Wu, Y.T., Li, S.H., Lui, W.Y., Wei, Y.H., Liu, T.Y. and Chi, C.W. (2004) Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer*, **90**, 2390–2396.
 30. He, Q.Y., Chen, J., Kung, H.F., Yuen, A.P. and Chiu, J.F. (2004) Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. *Proteomics*, **4**, 271–278.
 31. Shin, Y.K., Yoo, B.C., Chang, H.J., Jeon, E., Hong, S.H., Jung, M.S., Lim, S.J. and Park, J.G. (2005) Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res.*, **65**, 3162–3170.
 32. Di Liegro, C.M., Bellafiore, M., Izquierdo, J.M., Rantanen, A. and Cuezva, J.M. (2000) 3'-Untranslated regions of oxidative phosphorylation mRNAs function *in vivo* as enhancers of translation. *Biochem. J.*, **352**, 109–115.
 33. Herrera, B., Fernandez, M., Alvarez, A.M., Roncero, C., Benito, M., Gil, J. and Fabregat, I. (2001) Activation of caspases occurs downstream from radical oxygen species production, Bcl-xL down-regulation, and early cytochrome *c* release in apoptosis induced by transforming growth factor beta in rat fetal hepatocytes. *Hepatology*, **34**, 548–556.
 34. Herrera, B., Alvarez, A.M., Sanchez, A., Fernandez, M., Roncero, C., Benito, M. and Fabregat, I. (2001) Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. *FASEB J.*, **15**, 741–751.
 35. Matsuyama, S., Llopis, J., Deveraux, Q.L., Tsien, R.Y. and Reed, J.C. (2000) Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat. Cell. Biol.*, **2**, 318–325.
 36. Bowman, E.J., Siebers, A. and Altendorf, K. (1988) Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **85**, 7972–7976.
 37. Mathiasen, I.S. and Jaattela, M. (2002) Triggering caspase-independent cell death to combat cancer. *Trends Mol. Med.*, **8**, 212–220.
 38. Mattson, M.P. and Kroemer, G. (2003) Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol. Med.*, **9**, 196–205.
 39. Karawajew, L., Rhein, P., Czerwony, G. and Ludwig, W.D. (2005) Stress-induced activation of the p53 tumor suppressor in leukemia cells and normal lymphocytes requires mitochondrial activity and reactive oxygen species. *Blood*, **105**, 4767–4775.
 40. von Ahlsen, O., Renken, C., Perkins, G., Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E. and Newmeyer, D.D. (2000) Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome *c* release. *J. Cell. Biol.*, **150**, 1027–1036.
 41. Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L. and Youle, R.J. (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell*, **1**, 515–525.
 42. Jagasia, R., Grote, P., Westermann, B. and Conradt, B. (2005) DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature*, **433**, 754–760.
 43. Perfettini, J.L., Roumier, T. and Kroemer, G. (2005) Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell. Biol.*, **15**, 179–183.
 44. Scarlett, J.L., Sheard, P.W., Hughes, G., Ledgerwood, E.C., Ku, H.H. and Murphy, M.P. (2000) Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells. *FEBS Lett*, **475**, 267–272.
 45. Rego, A.C., Vesce, S. and Nicholls, D.G. (2001) The mechanism of mitochondrial membrane potential retention following release of cytochrome *c* in apoptotic GT1-7 neural cells. *Cell Death Differ.*, **8**, 995–1003.
 46. Buchet, K. and Godinot, C. (1998) Functional F1-ATPase essential in maintaining growth and membrane potential of human mitochondrial DNA-depleted rho degrees cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 22983–22989.
 47. Nicholls, D.G. and Ward, M.W. (2000) Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci.*, **23**, 166–174.
 48. Almeida, A., Almeida, J., Bolanos, J.P. and Moncada, S. (2001) Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 15294–15299.
 49. Votyakova, T.V. and Reynolds, I.J. (2001) DeltaPsi(m)-Dependent and independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J. Neurochem*, **79**, 266–277.
 50. Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L. and Parker, N. (2004) Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 755–767.
 51. Lambert, A.J. and Brand, M.D. (2004) Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem. J.*, **382**, 511–517.
 52. Chandra, J., Samali, A. and Orrenius, S. (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, **29**, 323–333.
 53. Martinvalet, D., Zhu, P. and Lieberman, J. (2005) Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*, **22**, 355–370.
 54. Klaunig, J.E. and Kamendulis, L.M. (2004) The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **44**, 239–267.
 55. Ricci, J.E., Munoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G.A., Yadava, N., Scheffler, I.E., Ellisman, M.H. and Green, D.R. (2004) Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell*, **117**, 773–786.
 56. Miramar, M.D., Costantini, P., Ravagnan, L., Saraiva, L.M., Haozi, D., Brothers, G., Penninger, J.M., Peleato, M.L., Kroemer, G. and Susin, S.A. (2001) NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J. Biol. Chem.*, **276**, 16391–16398.
 57. Lee, S.S., Lee, R.Y., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J. and Ruvkun, G. (2003) A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nat. Genet.*, **33**, 40–48.

Received November 15, 2005; revised December 1, 2005;
accepted December 13, 2005

Biogenesis and Dynamics of Mitochondria during the Cell Cycle: Significance of 3'UTRs

Marta Martínez-Díez, Gema Santamaría, Álvaro D. Ortega, José M. Cuezva*

Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Nowadays, we are facing a renaissance of mitochondria in cancer biology. However, our knowledge of the basic cell biology and on the timing and mechanisms that control the biosynthesis of mitochondrial constituents during progression through the cell cycle of mammalian cells remain largely unknown. Herein, we document the *in vivo* changes on mitochondrial morphology and dynamics that accompany cellular mitosis, and illustrate the following key points of the biogenesis of mitochondria during progression of liver cells through the cycle: (i) the replication of nuclear and mitochondrial genomes is synchronized during cellular proliferation, (ii) the accretion of OXPHOS proteins is asynchronously regulated during proliferation being the synthesis of β -F1-ATPase and Hsp60 carried out also at G2/M and, (iii) the biosynthesis of cardiolipin is achieved during the S phase, although full development of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) is attained at G2/M. Furthermore, we demonstrate using reporter constructs that the mechanism regulating the accretion of β -F1-ATPase during cellular proliferation is controlled at the level of mRNA translation by the 3'UTR of the transcript. The 3'UTR-driven synthesis of the protein at G2/M is essential for conferring to the daughter cells the original phenotype of the parental cell. Our findings suggest that alterations on this process may promote deregulated β -F1-ATPase expression in human cancer.

Citation: Martínez-Díez M, Santamaría G, Ortega AD, Cuezva JM (2006) Biogenesis and Dynamics of Mitochondria during the Cell Cycle: Significance of 3'UTRs. PLoS ONE 1(1): e107. doi:10.1371/journal.pone.0000107

INTRODUCTION

Cellular proliferation is an energy consuming activity that is stringently controlled by checkpoints of the cell cycle [1]. Transition from one phase of the cycle to the next is coordinated by the expression of specific cyclins and the sequential activation and inactivation of cyclin-dependent protein kinases [2]. Uncontrolled proliferation is one of the hallmarks of the cancer cell [3] that most often results from genetic alterations and/or the inactivation of master regulators of the cell cycle [4]. Cells that make the decision to divide must be therefore metabolically prepared to deal with the energetic demand imposed by proliferation. Alternatively, the cells can become reversibly arrested at the G1/S boundary (restriction point) of the cell cycle. In fact, compromising the cellular ATP levels by inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation [5,6] or by limiting the availability of glucose [1] or by genetic alterations that compromise the bioenergetic activity of mitochondria [7] result in G1 arrest of the cells. The G1/S arrest is triggered by a metabolic stress checkpoint of the cycle that is controlled by the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) [1] which is a metabolic sensor of the energy charge in higher eukaryotic cells [8]. The activation of AMPK promotes the phosphorylation of p53 at Ser15 [1], a modification that prevents its degradation and results in the cellular accumulation of p53 and cell-cycle arrest. Various studies have shown that entry of cells into the G1 phase of the cycle is associated with a burst of mitochondrial activity [5,9]. However, it appears that progression through the cycle is supported by non-respiratory modes of energy generation [10–12]. In fact, very recent findings in cells of mammals indicate that cyclin D1 which is involved in the phosphorylation and inactivation of the retinoblastoma protein, marking the entry of cells into the S phase of the cycle, inhibits mitochondrial function [13] and represses the activity of NRF-1 [14], a nuclear factor that masters the transcriptional expression of nuclear-encoded mitochondrial genes [15].

Mitochondria participate in a large number of essential cellular functions. Genetic or epigenetic alterations that impact on mitochondrial functions are thus involved in the development of

human pathologies with quite different phenotypic presentations [16], that include physiological ageing [17]. The provision of metabolic energy by oxidative phosphorylation (OXPHOS) is the best characterized function of mitochondria. In the process of oxidative phosphorylation, ATP is synthesized from ADP and Pi by the mitochondrial H^+ -ATP synthase [18], a rotatory engine complex of the inner mitochondrial membrane that utilizes as driving force the proton electrochemical gradient generated by the respiratory chain [19]. The catalytic activity of the H^+ -ATP synthase is located in the β -subunit of the water-soluble F1 portion (β -F1-ATPase) of the complex which is encoded in the nuclear genome [20]. The regulation of the expression of β -F1-ATPase is exerted at the level of translation [21–25]. The β -F1-ATPase mRNA (β -mRNA) further provides an example of a mitochondria-localized mRNA in both mammalian [26–29] and lower eukaryotic cells [30,31] whose efficient translation depends on the 3' non-translated region (3'UTR) of the mRNA [24,30,32,33]. Translation masking of β -mRNA occurred both in the fetal liver [24] and in hepatomas [25], compromising the biogenesis of mitochondria during development and in oncogenesis [34,35].

Academic Editor: Jürg Bähler, Wellcome Trust Sanger Institute, United Kingdom

Received September 8, 2006; Accepted November 24, 2006; Published December 20, 2006

Copyright: © 2006 Martínez-Díez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: M.M.-D, G.S. and A.D.O. are/were recipients of predoctoral fellowships from the Ministerio de Educación/Ciencia, Spain. This work was supported by grants from the Ministerio de Sanidad (PI041255), Educación y Ciencia (SAF-2005-4001 and BMC2001-0710) and Fundación Mutua Madrileña, Spain. The CBMSO is the recipient of an institutional grant from Fundación Ramón Areces.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: jmcuezva@cbm.uam.es

The biogenesis of mitochondria is a complex cellular event requiring the concerted expression of two physically separated genomes [15,35–37]. However, and despite the relevant role played by mitochondria in the onset and progression of human pathology, our knowledge of the timing of the biosynthesis of the different mitochondrial constituents and on the mechanisms that regulate their biosynthesis during cellular proliferation are scarce or remain largely unknown. Even less explored are the dynamics and changes in mitochondrial morphology during mitosis, a process that is likely to impact on the development of mitochondrial function and on the segregation of the organelles during progression through the cell cycle. Because of the renaissance of mitochondrial studies in cancer biology [38–41], in this work we have studied the timing of the biosynthesis of different mitochondrial constituents during progression through the cell cycle and the changes on mitochondrial morphology and dynamics that accompany cellular mitosis. Mechanistically, we document the relevance that the 3'UTR (3' non-translated region) of β -mRNA has for the synthesis of the protein at G2/M and illustrate the role that a regulatory mRNA sequence has for the appropriate biogenesis of mitochondria in the daughter cells with the same bioenergetic phenotype than that of the parental cell. This discovery highlights a previously unappreciated relationship between the control of translation at G2/M and the biogenesis of mammalian mitochondria that is likely to influence the cancer field.

RESULTS

Biosynthesis of mitochondrial constituents during the cell cycle

Subconfluent cultures of liver C9 cells were synchronized by metabolic arrest at the beginning of the S phase (see Fig. S1 in Supporting Information). The arrest of the cell cycle promoted a significant increase in the proportion of cells in G0/G1 concurrent with a reduction of the proportion of cells in S and G2/M (Fig. S1). At various times (0–10 h) after release from the metabolic block cells were recovered and the relative cellular content of mtDNA (Fig. 1A) and mitochondrial proteins (Fig. 1B) determined. It should be noted that at 4h after release from the arrest the percentage of cells in the different phases of the cycle were basically the same (Fig. S1) being the percentage of cells in G2/M 2-fold and 5-fold higher than that of non-arrested and arrested cells, respectively (Fig. S1). The relative cellular content of mitochondrial DNA (mtDNA), as determined by the ratio of the mitochondrial 12S rRNA gene to the nuclear β -F1-ATPase gene did not show significant deviations from the initially observed value (dotted line in Fig. 1A), suggesting that synthesis of nuclear and mitochondrial DNA is coordinated during cell cycle progression. Contrary to this finding, we observed that the relative cellular content of the catalytic subunit of the mitochondrial H^+ -ATP synthase (β -F1-ATPase/tubulin ratio) and of the structural heat shock protein 60 (hsp60) (hsp60/

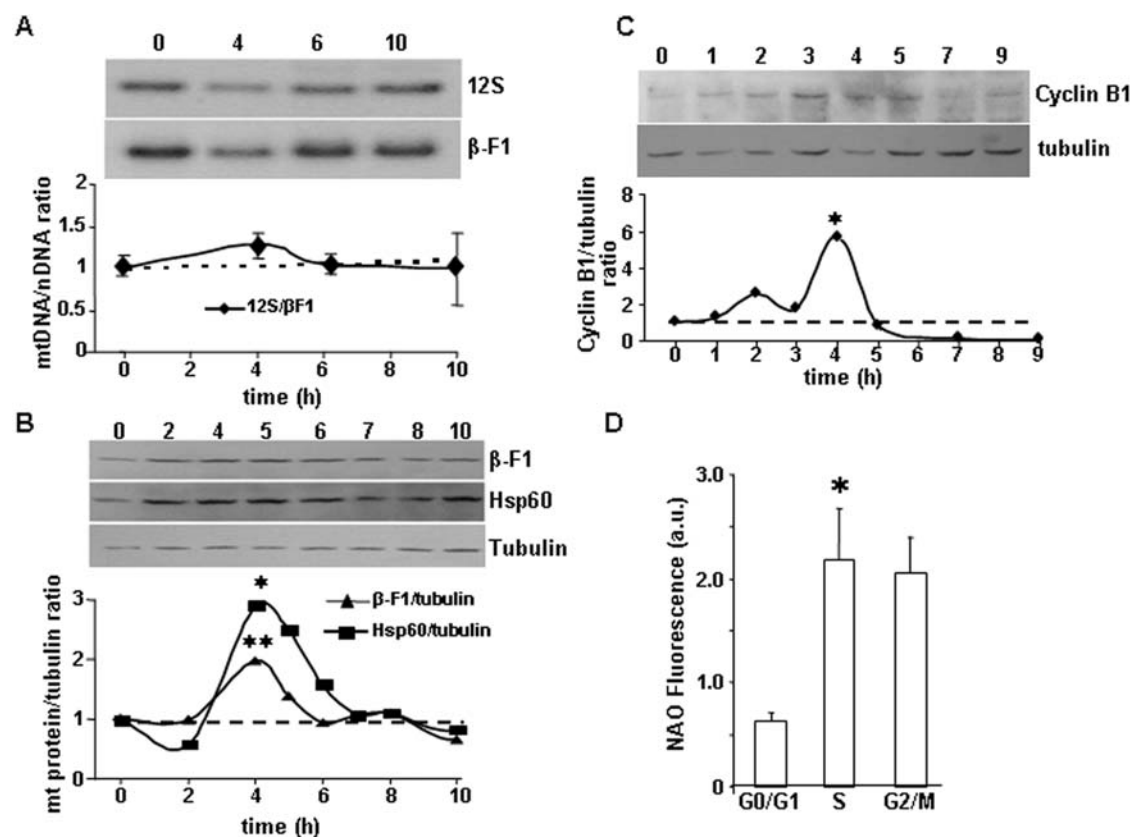


Figure 1. Changes in mitochondrial constituents during the cell cycle. Synchronized C9 cells (A–C) were recovered at the indicated time intervals and the relative cellular content of mtDNA (A) and proteins (B–C) determined. No significant changes in the cellular abundance of the mitochondrial 12S gene are observed. However, the cellular content of β -F1-ATPase, Hsp60 and cyclin B1 showed a significant increase at 4 h after release from the metabolic arrest. Representative experiments are shown (A–C). * and **, $P < 0.05$ and < 0.005 when compared with 0–2 h. D, The fluorescence intensity of the NAO probe was used to determine changes on mitochondrial mass during the cell cycle of non-synchronized C9 cells. The results shown are the means \pm SEM of three experiments. *, $P < 0.05$ when compared with cells in G0/G1. doi:10.1371/journal.pone.0000107.g001

tubulin ratio) showed a significant increase at 4 h (Fig. 1B). Analysis of the cellular expression level of cyclin B1 (cyclin B1/tubulin ratio), that is known to peak at mitosis, also revealed a significant increase 4h after initiation of the cell cycle (Fig. 1C), suggesting that mitosis is the cell-cycle phase where the preferential synthesis of these mitochondrial proteins is taking place.

To assess the build up of the inner mitochondrial membrane during progression through the cycle changes in the amount of cardiolipin were determined by flow cytometry using the fluorescent NAO probe (Fig. 1D). The mean fluorescence intensity of NAO-stained cells increased significantly in S phase when compared to cells in G0/G1 (Fig. 1D). No further significant changes were observed in NAO fluorescence in the cells at G2/M (Fig. 1D), indicating that the biosynthesis of the phospholipid of the inner membrane is completed in S phase.

Asynchronous accretion of mitochondrial proteins during the cycle

The cellular content of various mitochondrial proteins was further analyzed by flow cytometry in non-synchronized C9 cells (see Fig. S2 in Supplementary Information for controls of cytometry and representative experiments for each of the protein markers assayed). We observed that whereas the nuclear (COXIV) and mitochondrial (COXI) encoded subunits of respiratory complex IV (cytochrome c oxidase subunits IV and I, respectively) accumulated almost entirely during S phase (Figs. 2A and S2), the accumulation of β -F1-ATPase and hsp60 occurred throughout the cycle with a significant increase at G2/M when compared to cells in S phase (Figs. 2A and S2). The preferential build up of β -F1-ATPase and hsp60 at G2/M, and parallel accretion of these two proteins during the cycle, was further confirmed by western blotting of cells sorted according to their DNA content as revealed by the sharp increase in β -F1/COXIV ratio at G2/M (Fig. 2B) and the lack of significant deviations in β -F1/hsp60 ratio (Fig. 2B), respectively.

The preferential synthesis of β -F1-ATPase at G2/M occurs in the absence of changes in mRNA abundance

To explore the possibility that β -F1-ATPase mRNA abundance could be regulated during the cycle gearing the synthesis and accumulation of the protein we determined the relative cellular content of β -mRNA in synchronized C9 cells at various times after release from the metabolic block. The expression of β -mRNA was determined (Fig. 2C) in the same cultures where the protein expression was assessed (Fig. 1B). No significant changes in the relative cellular content of β -mRNA (as assessed by any of the following ratios: β -mRNA/18S rRNA, β -mRNA/ATPase 6–8 mRNA and β -mRNA/12S rRNA) was observed (Fig. 2C). Furthermore, we also determined the relative expression of β -mRNA in cells sorted according to their DNA content and found the lack of significant changes in the normalized expression of β -mRNA in the different phases of the cycle (1.00 ± 0.10 , 0.83 ± 0.12 and 1.21 ± 0.10 for cells in G0/G1, S and G2/M, respectively). Overall, the results suggest that the accumulation of the protein during cellular proliferation (Figs. 1B, 2A and 2B) is mainly controlled at the level of translation although it cannot be excluded that mechanisms that control the subcellular localization of the mRNA [26–29,31] might as well contribute to the observed accretion of the protein during the cell cycle.

Functional differentiation of mitochondria during the cell cycle

To assess the stage of functional differentiation of mitochondria during the cell cycle, changes in the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) were determined by FACS analysis using the TMRM⁺ probe. The mean fluorescence intensity of TMRM-stained cells increased significantly in S phase when compared to cells in G0/G1 (Fig. 2D). However, and contrary to the results observed with the NAO probe (Fig. 1D), the mean fluorescence intensity of TMRM-stained cells further showed a significant increase at G2/M (Fig. 2D), indicating that full development of $\Delta\Psi_m$ is attained only after G2/M-dependent events have been completed.

The presequence of β -F1-ATPase precursor targets gfp to the mitochondria

To test the possibility that changes in the translation efficiency of β -mRNA could trigger the accumulation of the protein during progression through the cycle we studied the expression of a gfp reporter derived from a construct that contained the 3'UTR regulatory element of β -mRNA translation [24,32]. However, and because of the cytotoxic effect of gfp when it is expressed in the cytoplasm [33] the development of stable cellular clones by this approach resulted unsuccessful. Therefore, we decided to target gfp to the mitochondria by inframe fusion at the N-terminal of gfp the presequence of the rat liver β -F1-ATPase precursor protein. This strategy allowed the generation of stable clones of mammalian cells that express gfp in their mitochondria (Fig. 3A) as assessed by confocal (Fig. 3B) and immunoelectron (Fig. 3C) microscopy. Interestingly, it was not possible to detect significant amounts of the p β -gfp chimeric protein in cellular extracts of the C9-p β GFP3' β clone (see Fig. 3D, lane 1), suggesting a fast and efficient *in vivo* import of the chimeric protein in this cell line. However, when transfecting the same construct into BHK cells we detected the p β -gfp precursor (Fig. 3D, lane 2). Moreover, treatment of these cells with carbonyl cyanide p-trifluoromethoxy-phenylhydrazone (FCCP), a drug that collapses $\Delta\Psi_m$ and prevents the import of precursor proteins into the organelle, revealed the rapid accumulation of p β -gfp in BHK cellular extracts (Fig. 3D, lanes 3). Upon removal of FCCP from the culture medium, the p β -gfp precursor was rapidly imported into mitochondria and processed to mature gfp (Fig. 3D, lane 4). These results illustrate cell-type specific differences in the import pathway of proteins into mitochondria in cells of mammals.

Gfp derived from the C9-p β GFP3' β clone is preferentially synthesized at G2/M

Analysis of the relative cellular expression level of gfp in non-synchronized C9-p β GFP3' β cells, as assessed by the gfp/tubulin ratio, revealed a constant expression level of the protein as cells proliferate (data not shown). In contrast, the same analysis in synchronized C9-p β GFP3' β cells revealed a significant and preferential accumulation of gfp at 4 h after release from the metabolic block (Fig. 4A), indicating that the synthesis of gfp driven from the construct that contains the presequence and 3'UTR of β -mRNA coincides with that of the endogenous β -F1-ATPase (Fig. 1B) and is preferential at the time of mitosis (Fig. 1C). Determination of the relative cellular content of the chimeric gfp-mRNA in synchronized C9-p β GFP3' β cells revealed a constant expression level of this mRNA during the cycle (Fig. 4B), suggesting that the accumulation of gfp at G2/M is controlled at the level of translation.

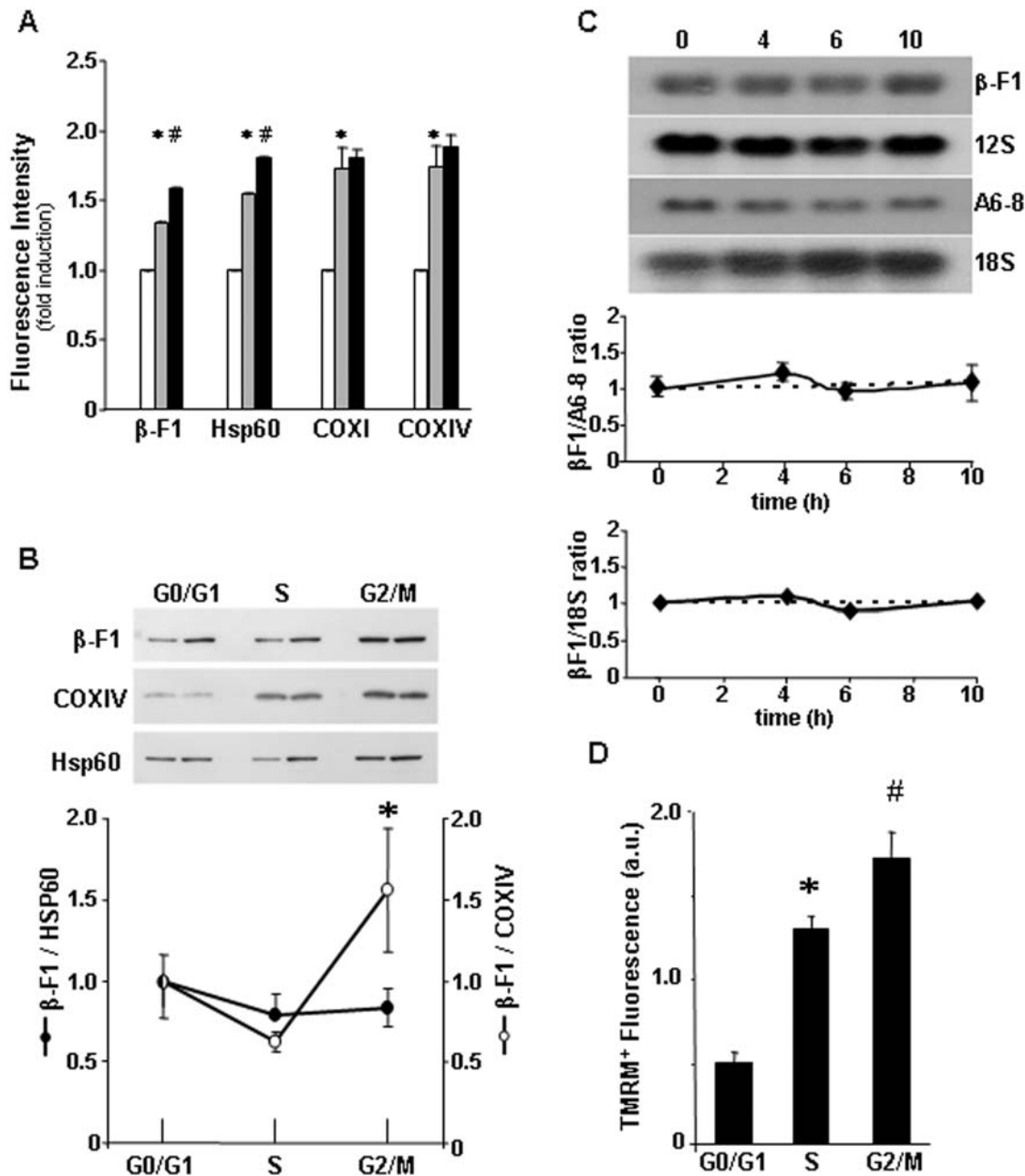


Figure 2. Asynchronous accumulation of mitochondrial proteins and development $\Delta\Psi_m$ during the cell cycle. **A**, Determination of the expression level of β -F1-ATPase (β -F1), Hsp60 and cytochrome c oxidase subunits I (COXI) and IV (COXIV) in C9 cells in the different phases of cell cycle by flow cytometry. Open bars, G0/G1; grey bars, S and black bars, G2/M. The results shown are the means \pm SEM of four experiments. * and #, $P < 0.05$ when compared with cells in G0/G1 and S, respectively. **B**, C9 cells were sorted by flow cytometry according to their DNA content and the protein extracts fractionated and blotted with the indicated antibodies. The two bands shown under each condition are from two independent experiments. The results shown in the graph are the means \pm SEM of three experiments. *, $P < 0.05$ when compared with cells in S phase. **C**, Synchronized C9 cells were recovered at the indicated time intervals and the relative cellular content of β -F1-ATPase mRNA determined by Northern-blot analysis. The mitochondrial encoded ATPase 6–8 mRNA and 12S rRNA and the nuclear encoded 18S rRNA were also determined. The results shown are the means \pm SEM of four experiments. **D**, FACS determination of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in C9 cells in the different phases of the cell cycle. The results shown are the means \pm SEM of three experiments. *, $P < 0.05$ when compared with cells in G0/G1. doi:10.1371/journal.pone.0000107.g002

The 3'UTR of β -mRNA controls the accumulation of the protein at G2/M

In order to define which of the two β -mRNA elements (presequence and 3'UTR) is responsible for the preferential synthesis of the protein at G2/M we generated additional stable

clones of the C9 cell line in which the 3'UTR of β -mRNA was replaced by the 3'UTR of mitochondrial transcription factor A (Tfam). The 3'UTR of Tfam lacks translation enhancing activity when compared to the activity of the 3'UTRs of other OXPHOS transcripts [33]. Consistent with this, we observed that the expression of gfp in C9-p β GFP3'Tfam cells was much less than

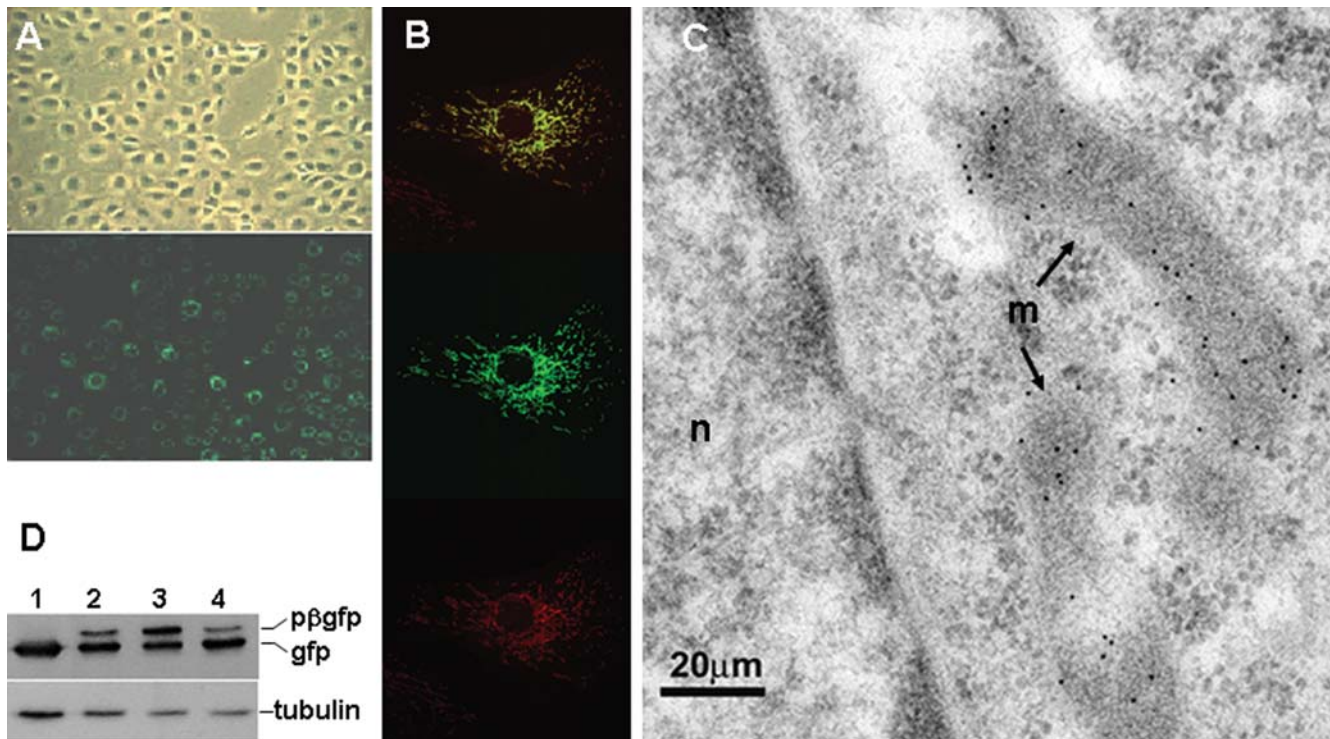


Figure 3. The presequence of β -F1-ATPase precursor targets gfp to mitochondria. The expression of gfp in C9 (A,B) and BHK (C) cells was assessed by fluorescence (A), immunofluorescence (B) and immunoelectron (C) microscopy. A, Illustrates by phase contrast (upper panel) and immunofluorescence (lower panel) the same low magnification field of C9-p β GFP3' β cells. B, C9-p β GFP3' β cells analyzed by immunofluorescence microscopy using anti- β -F1-ATPase antibody at 63 \times magnification. Upper panel, green gfp fluorescence; middle panel, red β -F1-ATPase immunostaining; lower panel, yellow merged image. C, Specific immunogold labeling (10 nm gold) of BHK mitochondria (m). Note the lack of gold labeling of other structures in the cytoplasm or in the nucleus (n) of the cell. D, Western blots of C9 (lane 1) and BHK cells (lanes 2–4) transfected with the p β GFP3' β construct. Fractionated proteins from the cellular extracts were probed with anti-gfp and anti-tubulin, the later as loading control. The migration of the p β -gfp chimera is also indicated. In lane 3, BHK cells have been previously treated with FCCP (4 μ M) plus oligomycin (2 μ M) for 1 hour. Note the accumulation of p β -gfp. In lane 4, BHK cells treated as in lane 3 were washed for 40 minutes before fractionation. Note the processing of p β -gfp to mature gfp. doi:10.1371/journal.pone.0000107.g003

that in C9-p β GFP3' β cells (Fig. 4C). However, the C9-p β GFP3'Tfam clone also efficiently targeted gfp to mitochondria in C9 cells showing no cellular accumulation of the p β -gfp chimera (Fig. 4C, and data not shown).

To assess the role of the 3'UTRs in the synthesis of gfp during the cycle we determined the relative changes in gfp fluorescence of the C9-p β GFP3' β and C9-p β GFP3'Tfam cells (Fig. 4D). In both clones the mean fluorescence intensity of the cells increased as they progress through the cycle (Fig. 4D). However, the relative increase in cellular fluorescence observed in C9-p β GFP3' β cells exceeded by far that determined in C9-p β GFP3'Tfam cells both in S phase and at G2/M (Fig. 4D). In fact, C9-p β GFP3'Tfam cells did not synthesize the amount of gfp that is required for appropriate cellular division into daughter cells with the same maternal gfp phenotype (Fig. 4D). Therefore, the results support that the 3'UTR of β -mRNA is the core controlling element required for the biosynthesis of β -F1-ATPase and for the appropriate biogenesis of mitochondria during cellular proliferation.

Dynamics of the mitochondrial network during mitosis

The mitochondrial network is a dynamic structure that is permanently subjected to remodeling by changes in the morphology and subcellular localization of the organelles [42]. Organelle changes are relevant for cellular metabolism [43], the execution of

apoptosis [6,44], Ca^{2+} signaling [45], viral infection [46] and impact on various human pathologies [47]. However, the timing of the morphological changes experienced by mitochondria during mitosis in cells of mammals is unknown. In this regard, the generation of mammalian cell lines with green mitochondria allowed us to visualize *in vivo* the morphology and dynamics of mitochondria during mitosis (see supporting video S1 and Fig. S3) as well as within the context of elements of the cytoskeleton (Fig. 5).

The analysis of synchronized C9-p β GFP3' β cells at 4h after release from the metabolic block confirmed that a large proportion of the cells (>40%) were undergoing mitosis (Fig. 5). The morphology of mitochondria in cells in interphase is that of threads, or of a tubular network, that it is intertwined with the tubulin and actin cytoskeleton. Mitochondria in cells in interphase are preferentially clustered around the nucleus, although some mitochondria are also located in the cell periphery (Fig. 5). By the time cells enter mitosis the mitochondrial tubular network is disorganized and fission of the thread-like organelles had occurred with some of the mitochondria already appearing as punctuate organelles (especially in metaphase) (Fig. 5). During the early stages of mitosis mitochondria are excluded from the cellular space where the mitotic spindle is being assembled (prophase) as well as from the equator of the spindle where the chromosomes line up (metaphase) (Fig. 5). During anaphase mitochondria still display a punctuate morphology appearing evenly distributed in the cell periphery (Fig. 5). By the time of late-anaphase or early-telophase

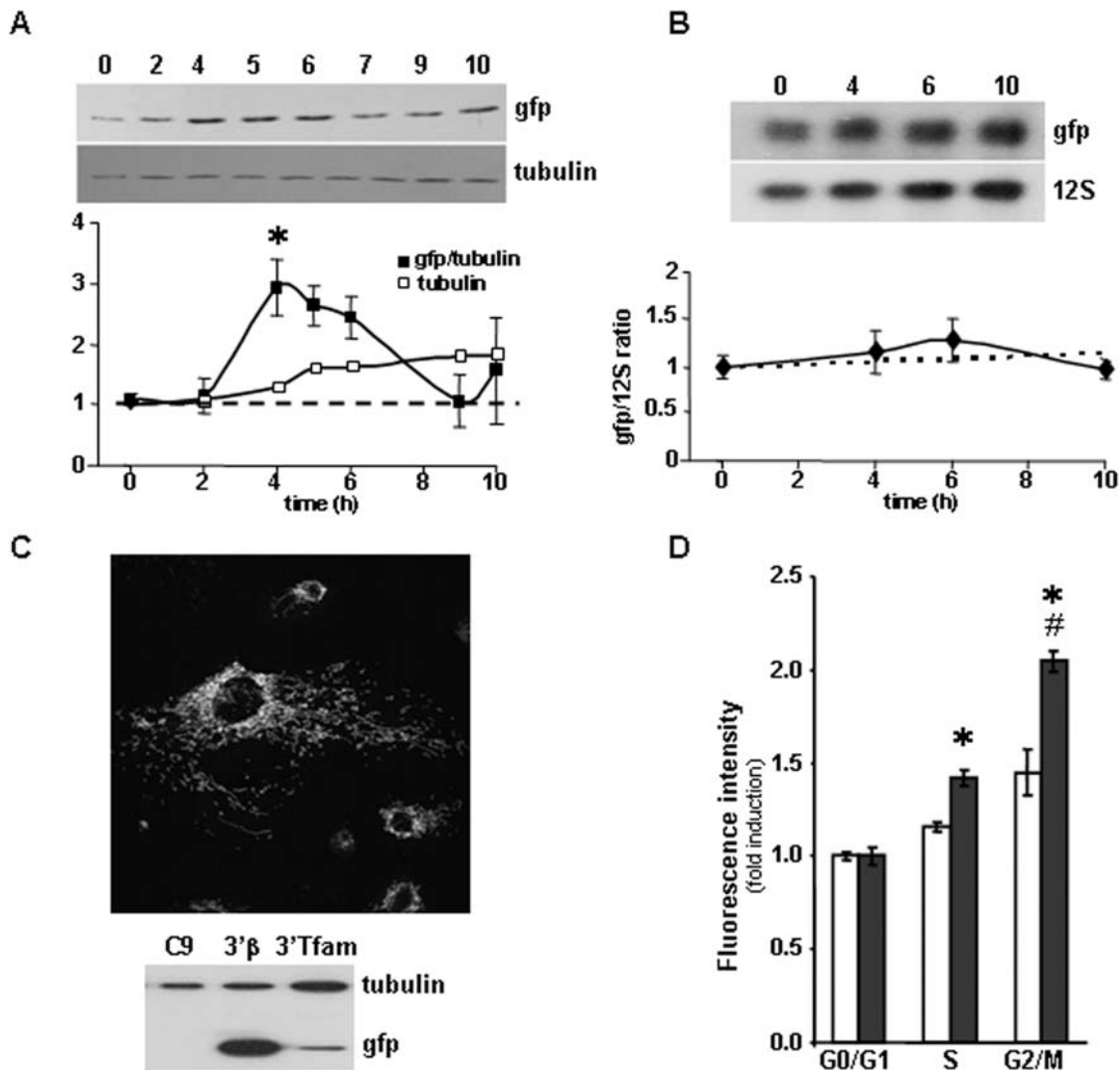


Figure 4. The 3'UTR of β -F1-ATPase mRNA controls the accumulation of the protein at G2/M. Synchronized C9-p β GFP3' β cells (A,B) were recovered at the indicated time intervals and the relative cellular content of gfp protein (gfp/tubulin ratio) (A) and gfp mRNA (gfp/12S ratio) (B) determined. The results shown are the means \pm SEM of three (A) and four (B) experiments. A significant accumulation of gfp protein was observed at four h after release from the metabolic arrest. *, $P < 0.0005$ when compared with 0–2 h. No significant changes in the cellular abundance of gfp mRNA was observed during cellular proliferation. C, The upper panel shows a merged image of the immunofluorescence microscopy of C9-p β GFP3' β cells that illustrates the co-localization of gfp and β -F1-ATPase, thus revealing the efficient targeting of gfp to mitochondria in this cellular clone (for other details see Fig. 3B). The lower panel shows the western blots of fractionated proteins from cellular extracts of parental C9 (C9), C9-p β GFP3' β (3' β) and C9-p β GFP3'Tfam (Tfam) cells simultaneously probed with anti-gfp and anti-tubulin. D, Analysis of gfp expression in C9-p β GFP3' β (closed bars) and C9-p β GFP3'Tfam (open bars) cells in the different phases of the cell cycle by flow cytometry. The results shown are the means \pm SEM of four experiments. *, $P < 0.05$ when compared with C9-p β GFP3' β cells and #, $P < 0.05$ when compared S with G2/M in C9-p β GFP3' β cells.
doi:10.1371/journal.pone.0000107.g004

some punctuate mitochondria initiate the repopulation of the spindle equator after the segregation of the daughter chromosomes had occurred (Fig. 5). In late-telophase, just before cytokinesis, mitochondria initiate their change in morphology also appearing as thread-like structures (Fig. 5). Overall, the cellular distribution of mitochondria during mitosis appears not to be co-distributed with the majority of the tubulin and β -actin cytoskeleton (Fig. 5). Of note is the enrichment of β -actin in the cell cortex (the red layer beneath the plasma membrane) during mitosis (Figs. 5g, 5h) that governs the formation of filopodia (the thin red stiff protrusions on Fig. 5g) responsible for promoting the dramatic changes in cell shape during mitosis (see phase contrast images on supporting video S1 and Fig. S3).

DISCUSSION

The timing of the biosynthesis of mtDNA in cells of mammals during progression through the cell-cycle is nowadays a matter of debate. In this regard, the replication of mtDNA has been described to proceed continuously during the cycle [48,49] or to occur at a specific stage of the cycle (late S-G2/M) after most nDNA synthesis has been completed [50,51]. The lack of significant changes on the cellular representation of mtDNA in liver cells during cellular proliferation suggests that mtDNA and nDNA synthesis is coordinated and supports a concerted trans-activation of the replication of both genomes [52]. The synchronous replication of both genomes is not incompatible with localized

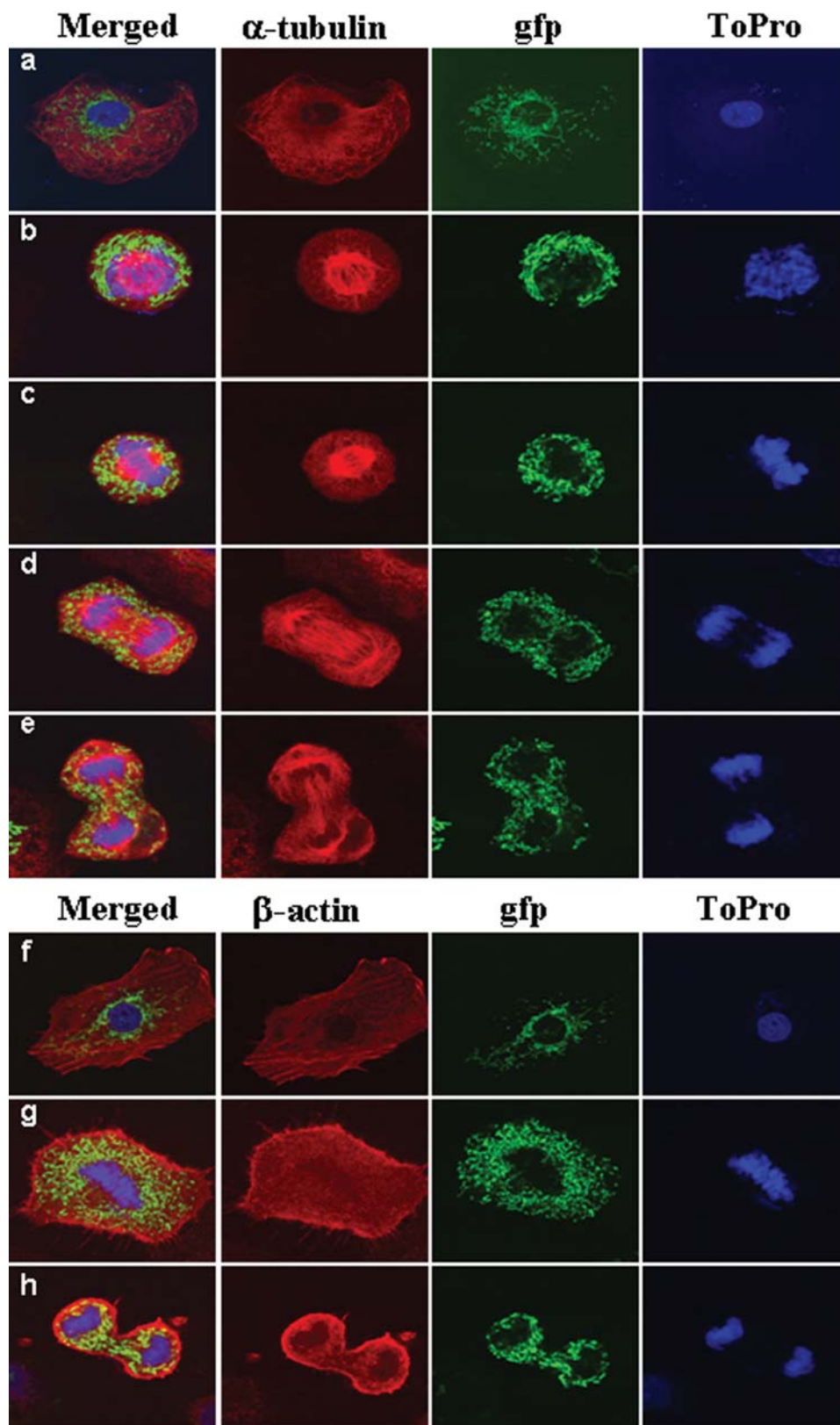


Figure 5. Morphological changes in the cellular mitochondrial network during mitosis. Synchronized mitochondria-tagged C9-p β GFP3' β cells were analyzed by immunofluorescence microscopy at four hours after release from the metabolic block. Typical morphologies of cells in interphase (a,f), prophase (b), metaphase (c,g), anaphase (d) and telophase (e,h) are shown at 60 \times magnification. The red fluorescence identifies the cytoskeletal proteins α -tubulin (a–e) and β -actin (f–h). The green fluorescence identifies mitochondria. The blue fluorescence reveals the stained nuclear DNA with the To-Pro probe.

doi:10.1371/journal.pone.0000107.g005

[53] or delocalized synthesis of mtDNA [49] which might represent events of mtDNA turnover and/or repair of the nucleoid.

Consistent with the prominent role played by cardiolipin in translation of mitochondrial proteins and on the biogenesis of OXPHOS complexes ([54–56] and references therein) we observed that synthesis of the mitochondrial encoded COXI protein is fully accounted in S phase concurrently with the synthesis of cardiolipin and of the nuclear-encoded counterpart subunit COXIV. However, we observed that a fully developed $\Delta\Psi_m$ is not attained until G2/M (Fig. 2D) [57]. The assembly and oligomerization of the H^+ -ATP synthase has been shown to play a critical role in the folding of the inner membrane into cristae morphology [58–60]. Moreover, in yeast cells the activity of the ATPase has been shown to be strictly required for the maintenance of mitochondrial integrity and mtDNA [61]. It is thus reasonable to suggest that the synthesis of β -F1-ATPase, and perhaps of other nuclear-encoded OXPHOS components whose synthesis is driven at G2/M, could rate-limit the development of a functional organelle during cellular proliferation.

The regulation of the expression of nuclear and mitochondrial genes during the cell cycle has been described at both the level of transcription [15,62,63] and by changes in the half-life of the mRNAs [15,63–65]. However, the buildup of β -F1-ATPase during cellular proliferation occurs in the absence of changes in the cellular abundance of its mRNA consistent with the stringent translational control described for this transcript [21–25]. Moreover, the expression of a reporter driven from a chimeric mRNA containing the regulatory 3'UTR of β -mRNA recapitulated the same pattern and mechanism of expression of the endogenous protein during cellular proliferation, providing the first indication that translation at G2/M is also required for the synthesis of an essential component of mitochondria, and supporting that cell-cycle regulated changes in the translational efficiency of some OXPHOS transcripts play a prominent role in the biogenesis of mitochondria.

It is well established that *cap*-dependent translation is inhibited at mitosis as a result of multiple events that lead to the disruption of the eIF4F complex [66]. At this stage of the cycle *cap*-independent translation drives the synthesis of relevant cellular proteins from a set of internal ribosome entry site (IRES)-containing mRNAs [67–69]. Consistent with the synthesis of β -F1-ATPase at G2/M, the translation of β -mRNA has been shown to have a lesser dependence on eIF4E than other cellular mRNAs [32]. Moreover, the 3'UTR of β -mRNA acts as a translation enhancing sequence [24,33] that displays IRES-like activity in dicistronic constructs [32]. Therefore, an important conclusion resulting from this work is that the 3'UTR-located IRES of β -mRNA is the target of cell cycle-dependent translational regulation.

The mammalian β -mRNA was the first nuclear-encoded transcript of the mitochondria shown to be localized and attached to the outer mitochondrial membrane [26–28]. Localization/translation of the mRNA requires two *cis*-acting elements respectively located in the ORF and in the 3'UTR of the mRNA [29]. The *cis*-acting element located on the ORF exerts a negative control on mRNA translation ([24] and Santamaria and Cuezva, unpublished observation). For efficient translation of β -mRNA it is required the IRES-like translation enhancing activity of the 3'UTR [24,32]. Such translation enhancing activity of the 3'UTR of β -mRNA has also been observed in the 3'UTRs of other transcripts involved in the OXPHOS system of mammals [33] and yeast [31] cells. In fact, ablation of the 3'UTR in the yeast β -F1-ATPase gene resulted in cells with respiratory

deficiency [30] although such phenotype has been attributed to a defective import of β -F1-ATPase rather than to the activity of the 3'UTR on translation. Consistent with this essential role of the 3'UTR of the transcript in the synthesis of β -F1-ATPase our efforts to develop a mouse with a genetic deletion on the 3'UTR of the β -F1-ATPase gene by homologous recombination (IngenKO, Australia) have resulted unsuccessful (data not shown).

The trans-acting factors of the 3'UTR of β -mRNA that have been shown to control the translation of the mRNA during liver development [24] and in oncogenesis [25] have poly A binding activity [70]. Unfortunately, the molecular nature of these RNA binding proteins still remains elusive. However, we have recently observed that both a reduced environment and a low ATP/ADP ratio favor the binding of these proteins to its target [70] what results in translation masking of the mRNA [22,24,25]. A burst of mitochondrial respiration has been noted upon serum stimulation of quiescent mammalian cells [9]. However, progression through the cell cycle is stringently controlled by the regulation of the metabolic pathways involved in energy generation [10,11,71]. Essentially, the “metabolic cycle” during cellular proliferation alternates between a first *oxidative phase* that is characterized by the biosynthesis of many cellular components (G1 phase) and is supported by the energy derived from mitochondrial activity followed by a *reductive phase* where the replication of DNA and the biosynthesis of mitochondria (S/G2/M phases) is supported by non-respiratory modes of energy generation [10,11,71]. The operation of the metabolic cycle in cells of mammals have received recent support after the observation that cyclin D1 represses mitochondrial function *in vivo* [13,14]. We therefore suggest that control of β -mRNA translation in the reductive phase that prevails at G2/M should have additional players that control the interactions of trans-acting factors of the 3'UTR with its target to allow the translation of the mRNA in such unfavorable metabolic situation. Since the expression of β -F1-ATPase is down-regulated in most human cancers [38,72] contributing to tumor progression [38,39,73] we believe that such regulators are responsible for promoting deregulated β -F1-ATPase expression in the cancer cell.

Finally, we presume that the rapid changes in mitochondrial morphology and dynamics that accompany mitosis might be of relevance for the appropriate segregation of the organelles and mtDNA into daughter cells during proliferation. We showed that fission of mitochondria is an early event of mitosis that might be triggered in response to the signaling cascades that accompany progression through the cell cycle. In fact, similar rapid fission events on the mitochondrial network are observed after treatment of the cells with an inhibitor of protein kinases [6]. Fission of the organelle is likely to be triggered by proteasomal degradation of mitofusins [74]. Functionally, fission of mitochondria assures a stochastic distribution of the organelles within the two daughter cells by a process that might be actively controlled and mediated by microtubules [75]. However, it has been reported that after mitochondrial fission 25–40% of the organelles lack mtDNA [76]. This situation could contribute to the asymmetric segregation of mtDNA into daughter cells explaining certain mtDNA depletion syndromes [47]. However, the fusion of mitochondria in late telophase, just before cytokinesis, a process that is controlled by mitofusins and the development of $\Delta\Psi_m$ [77], is likely to ameliorate the possible unequal distribution of mtDNA during cellular proliferation.

Overall, we have provided a comprehensive picture of the biogenesis of mammalian mitochondria during cellular proliferation and illustrated the relevance of translational control by the 3'UTR of an OXPHOS mRNA for the appropriate biogenesis of

the organelle during cell cycle progression. We hope that these findings will contribute to the understanding of certain human pathologies that impinge on organelle malfunction as a result of deregulated cellular proliferation.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures

Rat liver clone 9 (C9) and BHK (Baby Hamster Kidney) cells were grown at 37°C in DMEM with 10% fetal calf serum (FCS) [6]. Liver C9 cells were arrested at the beginning of S phase by a double thymidine block. In brief, subconfluent cultures were treated with 2 mM thymidine for 10 h. Afterwards, the cells were washed twice with DMEM and then grown for 6 hours in drug-free medium supplemented with 24 μ M 2'-deoxycytidine. Cells were arrested for a second time with 2 mM thymidine for 10 h and after grown in DMEM containing 24 μ M 2'-deoxycytidine.

DNA constructs and cellular cloning

The pJMI- β -F1 plasmid [24], that contains the full-length rat liver β -F1-ATPase cDNA, was digested with Ban I for obtaining the fragment encoding the mitochondrial targeting sequence of β -F1-ATPase. The resulting cDNA fragment was cloned in the Eco 47 III site of plasmids CDL-GFP- β -3'UTR and CDL-GFP-Tfam-3'UTR [33], that express chimaeric RNAs of GFP with the 3'-UTRs of β -F1-ATPase and Tfam mRNAs, respectively. The sequence of the resulting plasmids p β -GFP- β -3'UTR and p β -GFP-Tfam-3'UTR, both expressing the same fusion protein between the mitochondrial targeting sequence of β -F1-ATPase and GFP (p β -gfp), was verified by automated DNA sequencing. Cells were transfected at 60–80% confluence using 1 μ l of FUGENE 6 (Boehringer Mannheim, Germany) and 0.5 μ g of DNA/ 1×10^5 cells in 1 ml of culture medium [33]. Positive cells expressing GFP in their mitochondria were selected by incubation with 40 μ g/ml of geneticin (G-418) (GIBCO) and cloning cylinders (8 \times 8 mm).

Nucleic acids hybridizations

DNA and RNA were extracted from C9 cells and processed for hybridization of nucleic acids onto nylon membranes (GeneScreen) [33]. Membranes were incubated with [32 P]dCTP-labeled DNA probes [25], exposed to X-ray films and analyzed by densitometry. Cytoplasmic RNA of sorted cells was extracted with RNeasy mini kit (Qiagen) following the manufacturer instructions. RNA quality was assessed previously to retro-transcription (RT) with High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). qPCR was carried out on three different RT reactions. Oligonucleotides used for qPCR amplification were: 5'-gcaat-tattcccatgaacg-3' and 5'-gggacttaataacgcaagc-3' for 18S rRNA; 5'-ggtatggaatcctgtggcatccatgaaa-3' and 5'-gtgctaaaacgagctcag-taacagtc-3' for β -Actin mRNA and 5'-aaagctgtgcccctgaag-3' and 5'-ggagatgtcatagtcacctgct-3' for β -F1-ATPase mRNA. For qPCR, 5 ng of cDNA (template) and 0.5 μ M of each primer together with Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) were used following the protocol: 10' \times 95°C followed by 20–40 cycles of denaturation (15" \times 95°C) and annealing-elongation (1' \times 60°C) with fluorescence acquisition at 60°C. A melting curve (15" \times 95°C, 15" \times 60°C and 15" \times 95°C) with fluorescence acquisition at 60° to 95°C was included in each qPCR. The amplification efficiency of each primer was empirically determined and applied to the relative quantification of the data using qbase software (<http://medgen.ugent.be/qbase/>).

Western-blot

Cells were recovered from the plates by trypsin treatment, washed twice with PBS and boiled in loading buffer. Cellular proteins were fractionated on SDS-12% PAGE and then transferred onto PVDF membranes for immunoblot analysis [25]. The primary monoclonal antibodies used were: anti-GFP (Clontech, 1:1000), anti- α -tubulin (Sigma, 1:1000), anti-hsp60 (Stressgene SPA807, 1:3000), anti-COXIV (Molecular Probes, 1:100) and anti-cyclin B1 (Santa Cruz Biotechnology, 1:100). The primary polyclonal antibody used was anti- β -F1-ATPase (1:30000) [38]. Peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgGs (Nordic Immunology, 1:3000) were used as secondary antibodies. The blots were developed using the ECL[®] reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.).

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$ m) and mitochondrial mass

The fluorescent TMRM⁺ and NAO probes (Molecular Probes, Eugene, Oregon) were used to analyze $\Delta\Psi$ m and mitochondrial mass by flow cytometry, respectively [6]. The cellular fluorescence intensity was measured using a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, San José, CA.). For each analysis 10,000 events were recorded.

Flow Cytometry Analysis

For the determination of the cellular content of mitochondrial proteins in the different phases of the cell cycle, $\sim 1 \times 10^6$ C9 cells were washed in ice-cold staining buffer (1% BSA, 1% FCS and 0.01% sodium azide in PBS) and further incubated with primary monoclonal antibodies against β -F1-ATPase (Molecular Probes, 0.02 μ g/ μ l), Hsp60 (Stressgene, 0.01 μ g/ μ l), COXI and COXIV (Molecular Probes, both at 0.04 μ g/ μ l) in staining buffer supplemented with 0.3% saponin. The cells were then washed in ice-cold PBS-saponin buffer and incubated in the dark for 20 min with goat anti-mouse IgG conjugated to Alexa 488. Finally, the cells were resuspended in PBS-staining buffer containing 5 μ g/ml of propidium iodide (Sigma) and 100 μ g/ml RNase A and further incubated for 20 min at 37°C.

For the determination of the cellular content of the expressed GFP in C9-p β GFP3' β and C9-p β GFP3'Tfam cells, $\sim 1 \times 10^6$ cells were fixed with 0.25% paraformaldehyde in PBS for 5 min. After, the cells were resuspended in 70% ice-cold ethanol, collected by centrifugation and finally incubated for 30 min at 37°C in PBS containing 100 μ g/ml of RNase A and 20 μ g/ml of propidium iodide. The mean fluorescence intensity of the cells was determined after excitation at a wavelength of 488nm on a FACScan. For computer analysis only the signals from single cells were considered (10,000 cells/assay). Data analysis was carried out using Flow Jo 6.4.1 for Mac.

For the separation of the cells in G0/G1, S and G2/M phases of the cycle, cells were stained for 10 minutes with 5 μ g/ml of Hoechst 33342 added to the culture media. Cells ($\sim 5 \times 10^6$ cells/ml) were resuspended in PBS containing 5 mM EDTA, 25 mM HEPES pH 7.0 and the cellular aggregates removed by filtration through 70 μ m pore filters. Cells were sorted in a FACSCVantage SE (BD Biosciences, Erembodegen, Belgium) according to their DNA content and collected in 0.5 ml of FCS. The purity of each fraction was assessed in an aliquot of propidium iodide stained cells.

Immunofluorescence/confocal microscopy

Fluorescence and indirect immunofluorescence microscopy was performed on mitochondria-tagged GFP C9 cells as recently described in detail [6]. The primary antibodies used were mouse

monoclonal anti- α -tubulin and anti- β -actin (both from Sigma, 1:200). The primary polyclonal antibody used was anti- β -F1-ATPase (1:1000) [38]. After three PBS rinses, the cells were incubated for 1 h in the dark with goat anti-mouse or goat anti-rabbit IgGs conjugated to Alexa 594 (Molecular Probes) at 1:1000 dilution. The nuclei were stained with ToPro3 (Molecular Probes). Cellular fluorescence was analyzed by confocal microscopy using a Biorad Radiance 2000 Zeiss Axiovert S100TV using the following excitation/emission wave lengths: green (498/516 nm), red (590/617 nm) and blue (642/661 nm). The fluorescence emission of gfp was also analyzed in a Leica DMIRB fluorescence microscope equipped with a gfp excitation filter (Leica, BP 470/40).

Immunocytochemical localization of gfp by electron microscopy

Cells were fixed in freshly prepared 4% paraformaldehyde in 0.1 M Sørensen phosphate buffer, pH 7.2, for 2 h at 4°C. The free-aldehyde groups were quenched with 50 mM ammonium chloride in PBS for 60 min at 4°C. Samples were dehydrated in acetone and finally processed for embedding in Lowicryl K4M (Polysciences Europe, Eppelheim, Germany) [27]. Ultrathin sections were collected in collodion/carbon-coated nickel grids. Grids were incubated for 5 min with PBS containing 1% BSA and then incubated with anti-gfp (1:100). After three washes with PBS, grids were incubated for 45 min with goat anti-rabbit IgGs conjugated with 10 nm colloidal gold (British BioCell, Cardiff, UK). The grids were washed twice in PBS and distilled water, and air-dried. Counterstaining was performed with 2% aqueous uranyl acetate (6 min) and Reynolds lead citrate (45 s). Observation was performed in a Jeol 1010 electron microscope under 80 kV accelerating voltage.

Online supplementary material

For live imaging presented in the supplementary video, mitochondria-tagged gfp C9 cells were grown on glass plates and live images were taken in a Cell Observer Zeiss equipment using a Zeiss Axiovert 200 inverted microscope equipped with a Cool-snap FX CCD camera (Roper Scientific). Phase contrast and fluorescence images were taken every 3 min for 20 frames (1 h) with a 40 \times objective and a gfp filter. The Metamorph 6.1r6 (Universal Imaging) program was used for image processing.

SUPPORTING INFORMATION

Figure S1 Analysis of the level of synchrony in cell cultures. C9 cells were treated as described to induce the arrest of the cell cycle at the G0/G1-S transition. After the release from the arrest, cells were grown and analyzed by flow cytometry at different time-points after DNA staining with propidium iodide. The panels illustrate the cell cycle profiles of representative experiments for control, arrested and 2-h and 4-h after the release from the arrest. The graph summarizes the analysis of cell distribution during the cell cycle of four independent synchronization experiments. Open squares, control non-arrested cells; closed circles, arrested cells and closed triangles cells at 4 h after release from the arrest. The results

shown are the means \pm S.E.M. * and †, $P < 0.01$ when compared with control and arrested cells, respectively.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0000107.s001 (0.17 MB TIF)

Figure S2 Accumulation of mitochondrial proteins during the cell cycle. Determination of the expression level of mitochondrial proteins was carried out by flow cytometry after the staining of the cells with specific antibodies against β -F1-ATPase, Hsp60, COXI and COXIV. Irrelevant isotype-specific IgGs and antibodies against the T-cell receptor complex (TCRV β 8) were used as controls. The histograms in (a) show the overlay of the fluorescence intensity of each of the primary antibodies used (in blue) with the signal provided by the secondary antibody (in red) for the entire cell population analyzed. The histograms in (b) show the fluorescence intensity of the cells in G0/G1 (in red), S (in blue) and G2/M (in green) phases of the cell cycle. The mean fluorescence intensity for each cellular subpopulation is shown. Representative histograms are shown for each of the conditions tested. The results illustrate the lack of overlapping of the fluorescent signal of the mitochondrial markers with that of the secondary antibody or of the two controls (IgGs and TCRV β 8). Found at: doi:10.1371/journal.pone.0000107.s002 (0.17 MB TIF)

Figure S3 Changes in cellular morphology and on the mitochondrial network during mitosis. Different time-frames of phase contrast (left panel) and fluorescence (right panel) images taken from the supporting video 1 illustrate the changes in cellular morphology and of the mitochondrial network during mitosis, respectively. a, interphase; b, prophase; c, prometaphase; d, metaphase; e, anaphase and f, telophase. Phase contrast images allowed the visualization of filopodia (b,c) and chromosomes (d,e,f). Found at: doi:10.1371/journal.pone.0000107.s003 (0.65 MB TIF)

Video S1 Changes in cellular morphology and on the mitochondrial network during mitosis. Phase contrast (left panel) and fluorescence (right panel) images from mitochondria-tagged gfp C9 cells were obtained every 3 min. The cellular shape changes dramatically during mitosis. In prophase/prometaphase, the plasma membrane promotes the protrusion of thin filopodia for cellular detachment triggering the clustering of mitochondria towards the cell nuclei. Fission of thread-like mitochondria is observed as a very early event of the initiation of mitosis (~12–15 min) and is clearly finalized in metaphase. Some images representing individual frames of the movie are shown in Fig. S3. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0000107.s004 (5.04 MB AVI)

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Carlo M. Di Liegro (University of Palermo) and Fernando Martín (Parque Científico de Madrid) for his contributions in the initial development of this project. We thank Mrs. M. Chamorro for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JC MM GS AO. Performed the experiments: MM GS AO. Analyzed the data: JC MM GS AO. Contributed reagents/materials/analysis tools: MM GS AO. Wrote the paper: JC.

REFERENCES

- Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, et al. (2005) AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 18: 283–293.
- Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW (2005) Cyclins and cdk in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24: 2909–2915.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70.
- Vogelstein B, Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10: 789–799.
- Van den Bogert C, Muus P, Haanen C, Pennings A, Melis TE, et al. (1988) Mitochondrial biogenesis and mitochondrial activity during the progression of the cell cycle of human leukemic cells. *Exp Cell Res* 178: 143–153.

6. Santamaria G, Martinez-Diez M, Fabregat I, Cuezva JM (2006) Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis* 27: 925–935.
7. Mandal S, Guptan P, Owusu-Ansah E, Banerjee U (2005) Mitochondrial regulation of cell cycle progression during development as revealed by the tenured mutation in *Drosophila*. *Dev Cell* 9: 843–854.
8. Hardie DG (2005) New roles for the LKB1→AMPK pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17: 167–173.
9. Herzig RP, Scacco S, Scarpulla RC (2000) Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J Biol Chem* 275: 13134–13141.
10. Reinke H, Gatfield D (2006) Genome-wide oscillation of transcription in yeast. *Trends Biochem Sci* 31: 189–191.
11. Klevecz RR, Bolen J, Forrest G, Murray DB (2004) A genomewide oscillation in transcription gates DNA replication and cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1200–1205.
12. Tu BP, Kudlicki A, Rowicka M, McKnight SL (2005) Logic of the yeast metabolic cycle: temporal compartmentalization of cellular processes. *Science* 310: 1152–1158.
13. Sakamaki T, Casimiro MC, Ju X, Quong AA, Katiyar S, et al. (2006) Cyclin d1 determines mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biol* 26: 5449–5469.
14. Wang C, Li Z, Lu Y, Du R, Katiyar S, et al. (2006) Cyclin D1 repression of nuclear respiratory factor 1 integrates nuclear DNA synthesis and mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11567–11572.
15. Scarpulla RC (2002) Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* 286: 81–89.
16. Wallace DC (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39: 359–407.
17. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, et al. (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429: 417–423.
18. Capaldi RA, Aggeler R (2002) Mechanism of the F₁F₀-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem Sci* 27: 154–160.
19. Boyer PD (1997) The ATP synthase. A splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66: 717–749.
20. Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370: 621–628.
21. Tvrdik P, Kuzela S, Houstek J (1992) Low translational efficiency of the F₁-ATPase beta-subunit mRNA largely accounts for the decreased ATPase content in brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett* 313: 23–26.
22. Luis AM, Izquierdo JM, Ostronoff LK, Salinas M, Santarén JF, et al. (1993) Translational regulation of mitochondrial differentiation in neonatal rat liver. Specific increase in the translational efficiency of the nuclear-encoded mitochondrial beta-F₁-ATPase mRNA. *J Biol Chem* 268: 1868–1875.
23. Izquierdo JM, Ricart J, Ostronoff LK, Egea G, Cuezva JM (1995) Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of beta-F₁-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. *J Biol Chem* 270: 10342–10350.
24. Izquierdo JM, Cuezva JM (1997) Control of the translational efficiency of beta-F₁-ATPase mRNA depends on the regulation of a protein that binds the 3' untranslated region of the mRNA. *Mol Cell Biol* 17: 5255–5268.
25. López de Heredia M, Izquierdo JM, Cuezva JM (2000) A conserved mechanism for controlling the translation of beta-F₁-ATPase mRNA between the fetal liver and cancer cells. *J Biol Chem* 275: 7430–7437.
26. Egea G, Izquierdo JM, Ricart J, San Martín C, Cuezva JM (1997) mRNA encoding the beta-subunit of the mitochondrial F₁-ATPase complex is a localized mRNA in rat hepatocytes. *Biochem J* 322: 557–565.
27. Ricart J, Egea G, Izquierdo JM, San Martín C, Cuezva JM (1997) Subcellular structure containing mRNA for beta subunit of mitochondrial H⁺-ATP synthase in rat hepatocytes is translationally active. *Biochem J* 324: 635–643.
28. Lithgow T, Cuezva JM, Silver PA (1997) Highways for protein delivery to the mitochondria. *Trends Biochem Sci* 22: 110–113.
29. Ricart J, Izquierdo JM, Di Liegro CM, Cuezva JM (2002) The assembly of the ribonucleoprotein complex containing the mRNA of the β -subunit of the mitochondrial H⁺-ATP synthase requires the participation of two distal *cis*-acting elements and a complex set of cellular *trans*-acting proteins. *Biochem J* 365: 417–428.
30. Margeot A, Blugeon C, Sylvestre J, Vialette S, Jacq C, et al. (2002) In *Saccharomyces cerevisiae*, ATP2 mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function. *EMBO J* 21: 6893–904.
31. Sylvestre J, Margeot A, Jacq C, Dujardin G, Corral-Debrinski M (2003) The role of the 3' untranslated region in mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is conserved from yeast to human cells. *Mol Biol Cell* 14: 3848–3856.
32. Izquierdo JM, Cuezva JM (2000) Internal-ribosome-entry-site functional activity of the 3'-untranslated region of the mRNA for the beta subunit of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Biochem J* 346: 849–855.
33. Di Liegro CM, Bellafiore M, Izquierdo JM, Rantanen A, Cuezva JM (2000) 3'-Untranslated regions of oxidative phosphorylation mRNAs function in vivo as enhancers of translation. *Biochem J* 352: 109–115.
34. Valcarlos C, Navarrete RM, Encabo P, Loeches E, Satrústegui J, et al. (1988) Postnatal development of rat liver mitochondrial functions. The roles of protein synthesis and of adenine nucleotides. *J Biol Chem* 263: 7767–7775.
35. Cuezva JM, Ostronoff LK, Ricart J, López de Heredia M, Di Liegro CM, et al. (1997) Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J Bioenerg Biomembr* 29: 365–377.
36. Attardi G, Schatz G (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 4: 289–333.
37. Garesse R, Vallejo CG (2001) Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263: 1–16.
38. Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, Krajewski S, Santamaria G, et al. (2002) The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 62: 6674–6681.
39. Isidoro A, Casado E, Redondo A, Acebo P, Espinosa E, et al. (2005) Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 26: 2095–2104.
40. Garber K (2006) Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science* 312: 1158–1159.
41. Green DR, Chipuk JE (2006) p53 and metabolism: Inside the TIGAR. *Cell* 126: 30–32.
42. Nunnari J, Marshall WF, Straight A, Murray A, Sedat JW, et al. (1997) Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell* 8: 1233–1242.
43. Yaffe MP (1999) The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* 283: 1493–1497.
44. Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, et al. (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1: 515–525.
45. Szabadkai G, Simoni AM, Chami M, Wieckowski MR, Youle RJ, et al. (2004) Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca²⁺ waves and protects against Ca²⁺-mediated apoptosis. *Mol Cell* 16: 59–68.
46. Rojo G, Chamorro M, Salas ML, Vinuela E, Cuezva JM, et al. (1998) Migration of mitochondria to viral assembly sites in African swine fever virus-infected cells. *J Virol* 72: 7583–7588.
47. Okamoto K, Shaw JM (2005) Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 39: 503–536.
48. Bogenhagen D, Clayton DA (1977) Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* 11: 719–727.
49. Magnusson J, Orth M, Lestienne P, Taanman JW (2003) Replication of mitochondrial DNA occurs throughout the mitochondria of cultured human cells. *Exp Cell Res* 289: 133–142.
50. Posakony JW, England JM, Attardi G (1977) Mitochondrial growth and division during the cell cycle in HeLa cells. *J Cell Biol* 74: 468–491.
51. Radsak K, Schutz E (1978) Changes of mitochondrial DNA polymerase-gamma activity in synchronized mouse cell cultures. *Eur J Biochem* 89: 3–9.
52. Ruiz De Mena I, Lefai E, Garesse R, Kaguni LS (2000) Regulation of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein gene expression links nuclear and mitochondrial DNA replication in *drosophila*. *J Biol Chem* 275: 13628–13636.
53. Davis AF, Clayton DA (1996) In situ localization of mitochondrial DNA replication in intact mammalian cells. *J Cell Biol* 135: 883–893.
54. Ostrander DB, Zhang M, Milevskaya E, Rho M, Dowhan W (2001) Lack of mitochondrial anionic phospholipids causes an inhibition of translation of protein components of the electron transport chain. A yeast genetic model system for the study of anionic phospholipid function in mitochondria. *J Biol Chem* 276: 25262–25272.
55. Zhang M, Milevskaya E, Dowhan W (2002) Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 277: 43553–43556.
56. Jiang F, Ryan MT, Schlame M, Zhao M, Gu Z, et al. (2000) Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem* 275: 22387–22394.
57. Sweet S, Singh G (1999) Changes in mitochondrial mass, membrane potential, and cellular adenosine triphosphate content during the cell cycle of human leukemic (HL-60) cells. *J Cell Physiol* 180: 91–96.
58. Paumard P, Vaillier J, Couly B, Schaeffer J, Soubannier V, et al. (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* 21: 221–230.
59. Minauro-Sanmiguel F, Wilkens S, Garcia JJ (2005) Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F₀ bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12356–12358.
60. Lefebvre-Legendre L, Salin B, Schaeffer J, Brethes D, Dautant A, et al. (2005) Failure to assemble the alpha 3 beta 3 subcomplex of the ATP synthase leads to accumulation of the alpha and beta subunits within inclusion bodies and the loss of mitochondrial cristae in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280: 18386–18392.
61. Lefebvre-Legendre L, Balguerie A, Duvezin-Caubet S, Giraud MF, Slonimski PP, et al. (2003) F₁-catalysed ATP hydrolysis is required for mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* growing under conditions where it cannot respire. *Mol Microbiol* 47: 1329–1339.
62. Kim H, You S, Kim IJ, Farris J, Foster LK, et al. (2001) Increased mitochondrial-encoded gene transcription in immortal DF-1 cells. *Exp Cell Res* 265: 339–347.

63. Luciakova K, Li R, Nelson BD (1992) Differential regulation of the transcript levels of some nuclear- encoded and mitochondrial-encoded respiratory-chain components in response to growth activation. *Eur J Biochem* 207: 253–257.
64. Lunardi J, Attardi G (1991) Differential regulation of expression of the multiple ADP/ATP translocase genes in human cells. *J Biol Chem* 266: 16534–16540.
65. Kindy MS, Brown KE, Sonenshein GE (1991) Regulation of expression of the growth-state-related genes 2F1 and 2A9 during entry of quiescent smooth muscle cells into the cell cycle. *J Cell Biochem* 46: 345–350.
66. Pyronnet S, Sonenberg N (2001) Cell-cycle-dependent translational control. *Curr Opin Genet Dev* 11: 13–18.
67. Cornelis S, Bruynooghe Y, Denecker G, Van Huffel S, Tinton S, et al. (2000) Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5: 597–605.
68. Pyronnet S, Pradayrol L, Sonenberg N (2000) A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5: 607–616.
69. Qin X, Sarnow P (2004) Preferential translation of internal ribosome entry site-containing mRNAs during the mitotic cycle in mammalian cells. *J Biol Chem* 279: 13721–13728.
70. Izquierdo JM, Cuezva JM (2005) Epigenetic regulation of the binding activity of translation inhibitory proteins that bind the 3' untranslated region of beta-F1-ATPase mRNA by adenine nucleotides and the redox state. *Arch Biochem Biophys* 433: 481–486.
71. Tu BP, McKnight SL (2006) Metabolic cycles as an underlying basis of biological oscillations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 696–701.
72. Isidoro A, Martinez M, Fernandez PL, Ortega AD, Santamaria G, et al. (2004) Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J* 378: 17–20.
73. Cuezva JM, Chen G, Alonso AM, Isidoro A, Misek DE, et al. (2004) The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis* 25: 1157–1163.
74. Neutzner A, Youle RJ (2005) Instability of the mitofusin Fzo1 regulates mitochondrial morphology during the mating response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280: 18598–18603.
75. Nishida K, Yagisawa F, Kuroiwa H, Nagata T, Kuroiwa T (2005) Cell cycle-regulated, microtubule-independent organelle division in *Cyanidioschyzon merolae*. *Mol Biol Cell* 16: 2493–2502.
76. Legros F, Malka F, Frachon P, Lombes A, Rojo M (2004) Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci* 117: 2653–2662.
77. Legros F, Lombes A, Frachon P, Rojo M (2002) Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 13: 4343–4354.



Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma

Baskaran Govindarajan,¹ James E. Sligh,² Bethaney J. Vincent,² Meiling Li,² Jeffrey A. Canter,² Brian J. Nickoloff,³ Richard J. Rodenburg,⁴ Jan A. Smeitink,⁴ Larry Oberley,⁵ Yuping Zhang,⁵ Joyce Slingerland,⁶ Rebecca S. Arnold,⁷ J. David Lambeth,⁷ Cynthia Cohen,⁷ Lu Hilenski,⁸ Kathy Griendling,⁸ Marta Martínez-Diez,⁹ José M. Cuezva,⁹ and Jack L. Arbiser¹

¹Department of Dermatology, Emory University School of Medicine, and Atlanta Veterans Administration Medical Center, Atlanta, Georgia, USA.

²Division of Dermatology and Center for Human Genetics Research, Vanderbilt University Medical Center and VA Tennessee Valley Healthcare System, Nashville, Tennessee, USA. ³Cardinal Bernardin Cancer Center, Loyola University Health System, Chicago, Illinois, USA.

⁴Nijmegen Centre for Mitochondrial Disorders, Department of Paediatrics, Radboud University Medical Centre Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands. ⁵Free Radical and Radiation Biology Program, Department of Radiation Oncology, University of Iowa, Iowa City, Iowa, USA.

⁶Department of Medicine, University of Miami Leonard M. Miller School of Medicine, Miami, Florida, USA. ⁷Department of Pathology and Laboratory Medicine and ⁸Department of Medicine, Division of Cardiology, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia, USA.

⁹Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

Melanoma is the cancer with the highest increase in incidence, and transformation of radial growth to vertical growth (i.e., noninvasive to invasive) melanoma is required for invasive disease and metastasis. We have previously shown that p42/p44 MAP kinase is activated in radial growth melanoma, suggesting that further signaling events are required for vertical growth melanoma. The molecular events that accompany this transformation are not well understood. Akt, a signaling molecule downstream of PI3K, was introduced into the radial growth WM35 melanoma in order to test whether Akt overexpression is sufficient to accomplish this transformation. Overexpression of Akt led to upregulation of VEGF, increased production of superoxide ROS, and the switch to a more pronounced glycolytic metabolism. Subcutaneous implantation of WM35 cells overexpressing Akt led to rapidly growing tumors in vivo, while vector control cells did not form tumors. We demonstrated that Akt was associated with malignant transformation of melanoma through at least 2 mechanisms. First, Akt may stabilize cells with extensive mitochondrial DNA mutation, which can generate ROS. Second, Akt can induce expression of the ROS-generating enzyme NOX4. Akt thus serves as a molecular switch that increases angiogenesis and the generation of superoxide, fostering more aggressive tumor behavior. Targeting Akt and ROS may be of therapeutic importance in treatment of advanced melanoma.

Introduction

Melanoma is a common skin cancer resulting in high morbidity and mortality. Melanomas are neural crest-derived malignancies, many of which arise in precursor lesions termed *atypical nevi*. A fraction of atypical nevi undergo further malignant change into radial growth melanoma, named for its superficial spreading growth characteristics. Radial growth melanomas undergo further genetic change, acquiring invasive, angiogenic, and metastatic capabilities, leading to recurrence, distant metastases, and death. Once melanoma has spread beyond its original location, it is usually highly resistant to chemotherapy and radiation. Thus, an improved understanding of the signaling mechanisms that contribute to invasive growth is required.

Several genes have been implicated in the development of melanoma. The most common gene involved in familial melanoma is p16^{ink4a}, which has been implicated in at least one-third of familial melanomas. In addition, loss of p16^{ink4a} through deletion, mutation, or promoter methylation is a common event in sporadic melanoma. More recently, B-raf has been implicated in both melanomas and atypical nevi, with a very high frequency

of activating V599 lesions in both melanomas and nevi. We have previously demonstrated that activation of MAP kinase occurs in early melanoma, but not benign nevi, and that constitutive activation of MAP kinase signaling leads to malignant transformation of melanocytes but not to a very aggressive phenotype (1, 2). These findings suggest that other signaling pathways must be required for the transformation of radial growth (i.e., non-invasive) melanoma to vertical growth (i.e., invasive) melanoma. Akt is a prime candidate for a second signaling pathway that can cause aggressive growth in melanoma: (a) it confers resistance to a number of apoptotic stimuli, including Fas ligand and tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligands (3–5); (b) it inactivates several potential tumor suppressor genes, including tuberlin and the forkhead family of transcription factors (6, 7); (c) it is expressed in advanced human melanomas (8); and (d) the genetics of melanoma suggests a functional role of Akt in melanoma pathogenesis. The most commonly mutated oncogenes in melanoma are B-raf and N-ras (9–12). B-raf alone is incapable of activating Akt, while N-ras can. Thus, melanomas that have mutant B-raf often exhibit loss of PTEN, a negative regulator of Akt, allowing Akt activation in advanced lesions (13–16). In this study, we demonstrated that Akt expression allowed aggressive tumor growth of human cells in vivo.

ROS have been found in a large number of tumor types (17, 18). While exposure of primary cells to ROS results in senescence, ROS may serve as a signaling mechanism in tumor cells to pro-

Nonstandard abbreviations used: CAT, catalase; COII, cytochrome oxidase II; mtDNA, mitochondrial DNA; ND, NADH dehydrogenase; TGCE, temperature gradient capillary electrophoresis.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J. Clin. Invest.* 117:719–729 (2007). doi:10.1172/JCI31012.

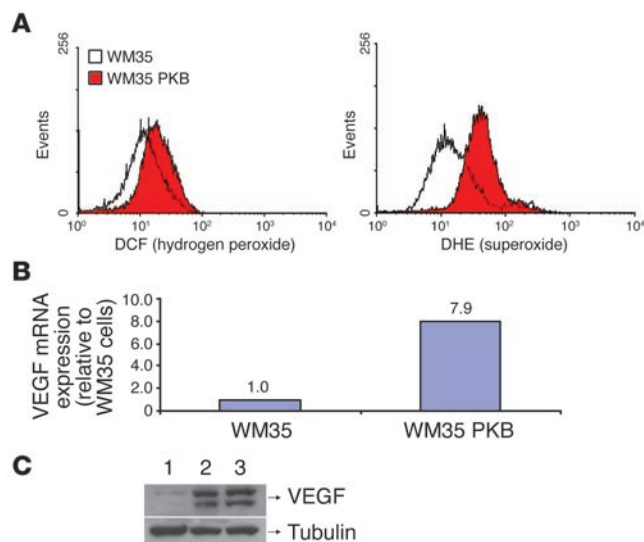


Figure 1

Introduction of Akt into WM35 cells results in increased intracellular ROS. **(A)** Quantitation of hydrogen peroxide by dichlorofluorescein (DCF) fluorescence and of superoxide by dihydroethidium (DHE) fluorescence. **(B)** Akt overexpression led to increased expression of VEGF mRNA. **(C)** Increased expression of VEGF protein in WM35 cells overexpressing Akt compared with parental controls. Lane 1, WM35 cells; lane 2, WM35 PKB^{DD} cells; lane 3, pooled Akt-transduced WM35 cells. Tubulin is included as a loading control. Experiments were performed in triplicate.

mote angiogenesis, mitogenesis, and resistance to apoptosis (19–23). Introduction of oncogenes into immortalized cells has been demonstrated to increase ROS within cells, and ROS-generating genes such as *NOX* family members have been shown to contribute to tumorigenesis and angiogenesis in vivo (24–28). PI3K activation has been associated with transformation of mel-

anoma (29); however, despite a plethora of downstream effectors that may be involved, the mechanisms whereby PI3K mediates its oncogenic effects have not been fully elucidated. Here we demonstrated that the introduction of a single gene, Akt, into radial growth melanoma cells was sufficient to cause vertical growth in vivo. We further demonstrated that Akt induced genes associated with resistance to ROS, including Sirt1 and rictor, and activation of the AP-1 subunit JunD. Akt thus serves as a prominent pharmacologic target in the treatment of melanoma and other malignancies.

Results

Stable WM35 cells overexpressing Akt (WM35 PKB^{DD}) exhibited a highly significant increase in intracellular superoxide (Figure 1A). As WM35 cells overexpressing Akt had increased levels of ROS, and because we have previously shown that ROS

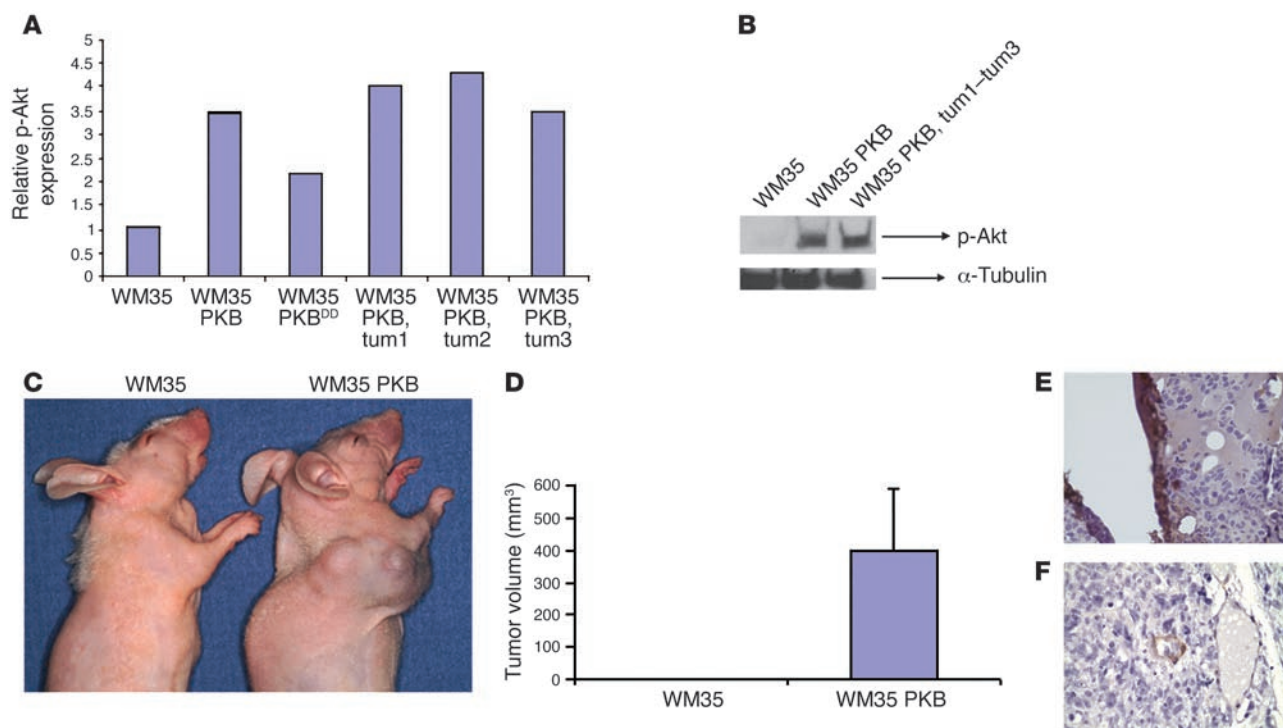


Figure 2

Akt causes vertical growth melanoma in vivo. **(A)** Parental WM35 cells, pooled Akt-transduced WM35 cells prior to implantation in vivo (WM35 PKB and WM35 PKB^{DD}), and cells derived from tumors of mice injected with WM35 PKB cells (tum1–tum3) were examined for expression of phosphorylated Akt (p-Akt). The experiment was performed in triplicate. **(B)** Representative Western blot of phosphorylated Akt and α -tubulin; overexpression converted radial growth melanoma to vertical growth melanoma. **(C and D)** Mice ($n = 4$ per group) were injected with either vector control or Akt-expressing melanoma cells and were observed at 1 month. **(E)** Immunohistochemistry for VEGF. A high level of VEGF expression was noted, especially surrounding necrotic areas. **(F)** Smooth muscle actin immunohistochemistry, demonstrating that tumors were highly angiogenic. Note the invasion of tumor cells into vessel at the image's center. Original magnification, $\times 100$.

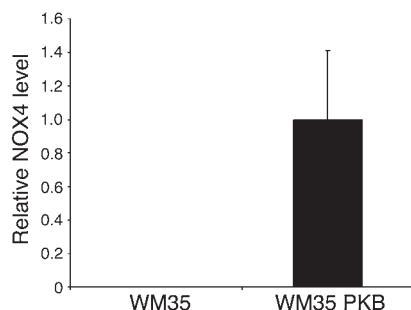


Figure 3

Transfection of Akt induces NOX4 expression in melanoma cells. Levels of NOX4 in each sample were normalized to 18S RNA. Data represent a sample set of 5. In 2 separate experiments, NOX4 was observed in the WM35 PKB cells and not in the WM35 cells. A 1.5% agarose gel was run after PCR, and single bands for NOX4 and for 18S were observed (not shown).

upregulates VEGF and tumorigenesis, we compared production of VEGF in Akt-overexpressing and parental WM35 cells. In vitro growth of WM35 cells in the presence or absence of Akt was not significantly different (data not shown). Akt overexpression led to a nearly 8-fold increase in VEGF mRNA expression (Figure 1B). Increased expression of VEGF protein was observed in Akt-overexpressing WM35 cells (Figure 1C). A high level of phosphorylated Akt expression was observed in WM35 cells transduced with Akt and in tumors derived from mice injected with WM35 PKB cells (Figure 2, A and B). Implantation of Akt-overexpressing WM35 into nude mice led to the development of tumors, whereas no tumor induction was observed in vector-transfected WM35 cells (Figure 2, C and D). Akt-overexpressing WM35 tumors showed high levels of VEGF expression, particularly around the necrotic areas (Figure 2E), and smooth muscle actin immunohistochemistry demonstrated that these tumors were highly angiogenic (Figure 2F). In order to assess the mechanism of induction of ROS generation, we examined several of its potential sources. Several ROS-generating enzymes have been cloned and constitute the NOX family of enzymes. Increased expression of NOX genes has been previously shown to cause generation of ROS (28). In Akt-transformed WM35 PKB^{DD} cells, which were cultured for long periods of time (approximately 6 months), RT-PCR revealed no elevation of the mRNAs encoding the NOX family genes (NOX1–NOX5), suggesting that upregulation of NOX genes is unlikely to account for the increased ROS observed in Akt-transformed cells. In contrast, WM35 PKB cells, which were in culture after Akt transfection for shorter periods of time

(1–2 months) showed marked induction of NOX4, demonstrating at least 2 potential mechanisms that could contribute to the transforming effects of Akt (Figure 3).

Implantation of Akt-overexpressing WM35 into nude mice led to the development of tumors, whereas no tumor induction was observed in vector-transfected WM35 cells (Figure 2, C and D). Thus, Akt overexpression is sufficient to transform WM35 radial growth melanoma cells to highly invasive tumors in vivo. The AP-1 subunit composition of aggressive melanoma has previously been noted to differ from nonaggressive melanoma in that JunD is highly expressed in the former (30, 31). We examined activation of JunD prior to and after Akt-mediated transformation. A dramatic and consistent elevation of phosphorylated JunD was noted in Akt-derived tumors compared with cells prior to transformation and implantation (Figure 4A). A high level of JunD expression may sensitize melanoma cells to alternative forms of apoptosis, such as activating transcription factor 2 (ATF2) antagonists (31).

Melanoma cells have demonstrated resistance to multiple insults, including oxidative stress. We examined a spontaneous human melanoma cell line, A375, in the presence of a specific Akt inhibitor. Treatment of this spontaneous melanoma with the Akt inhibitor resulted in significant decreases in 3 genes that may account for this resistance. Sirt1 is a deacetylase that attenuates p53 in the presence of oxidative stress; rictor is a rapamycin-insensitive member of the mammalian target of rapamycin complex; and VEGF is likely the major angiogenic factor in melanoma. Inhibition of Akt led to significant and reproducible decreases in the mRNA levels of all 3 genes (Figure 4, B–D).

Highly malignant tumor cells have been demonstrated to possess both high levels of ROS and altered bioenergetics (17, 18).

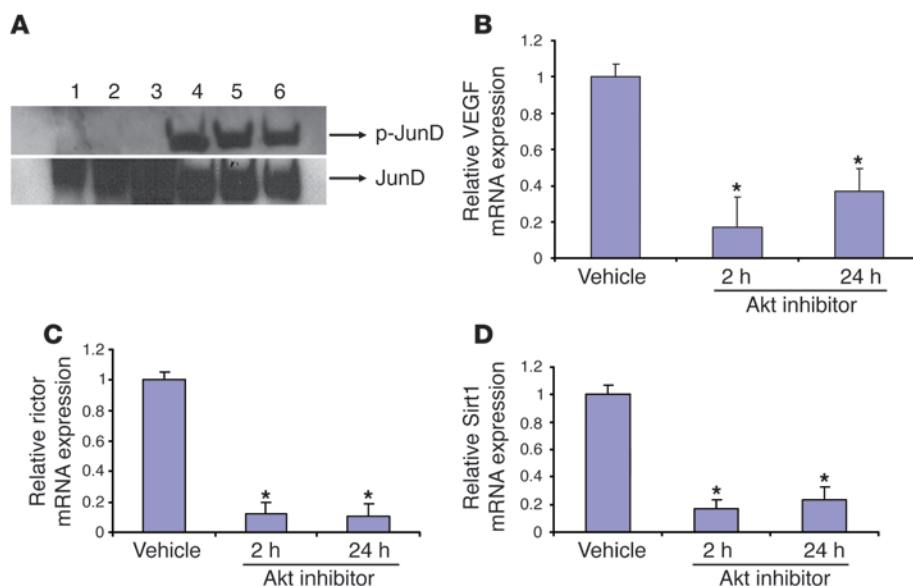
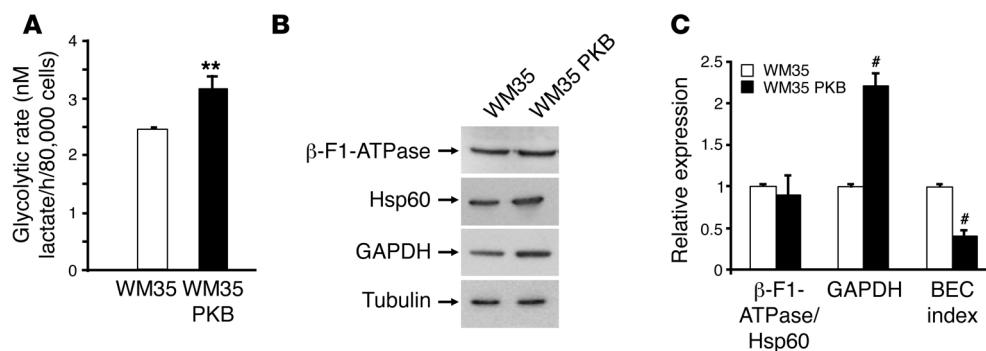


Figure 4

Akt inhibition downregulates VEGF, rictor, and Sirt1. (A) Triplicate analysis of pooled WM35 cells transfected with Akt demonstrated activation (phosphorylation) of JunD in melanoma tumors. Lane 1, WM35 cells; lane 2, WM35 PKB^{DD} cells (which have numerous mitochondrial mutations); lane 3, pooled WM35 cells freshly transfected with active PKB prior to tumor implantation; lanes 4–6, protein from individual tumors derived after injection of pooled WM35 PKB cells into mice. (B–D) Akt inhibition in A375 melanoma cells resulted in downregulation of VEGF (B), rictor (C), and Sirt1 (D) RNA. A375 cells were treated with Akt inhibitor and harvested at 2 and 24 hours. RNA levels are corrected for 18S RNA, and experiments were performed in triplicate. **P* < 0.05 versus vehicle.

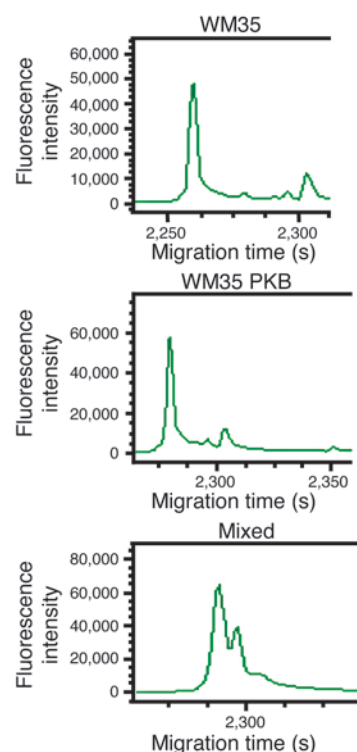
**Figure 5**

Introduction of Akt converted WM35 cells to glycolytic metabolism (Warburg effect). (A) Glycolysis rates were determined in the presence of oligomycin. Results are mean \pm SEM of 6 experiments. (B) Western blot analysis of mitochondrial β -F1-ATPase and Hsp60 and glycolytic enzyme GAPDH compared with tubulin, used as a loading control. (C) Relative expression level of the indicated mitochondrial markers as assessed by the β -F1-ATPase/Hsp60 ratio and by GAPDH relative to tubulin. The bioenergetic cellular (BEC) index showed a significant decrease in WM35 PKB cells, consistent with their conversion to a glycolytic phenotype. Results are mean \pm SEM of 4 experiments. ** $P < 0.01$, # $P < 0.0005$ versus WM35.

Because we saw no source for extramitochondrial ROS generation in those cells cultured for long periods of time, cells were examined for mitochondrial bioenergetic function and for the presence of mitochondrial DNA mutation. Mitochondrial dysfunction, notably in complex I, has previously been associated with generation of ROS (32–35). Complex I activity was markedly decreased in Akt-transformed cells compared with parental radial growth melanoma cells (4 units versus 160 units). Consistent with diminished activity of the mitochondrial respiratory complex, which could hamper the bioenergetic function of mitochondria in active Akt-expressing cells, we observed significantly augmented glycolysis rates in WM35 PKB^{DD} cells compared with parental WM35 cells (Figure 5A). In agreement with these results, the expression of active Akt in the cells promoted a doubling in the expression of the glycolytic marker GAPDH (Figure 5B) without significantly affecting the expression of other bioenergetic markers of the mitochondria. As a result of these changes, the bioenergetic cellular index of melanoma cells expressing active Akt showed a 50% decrease compared with parental WM35 cells (Figure 5C). Overall, these results indicate that expression of active Akt impairs the bioenergetic function of mitochondria, at least at the level of complex I activity, with concurrent generation of ROS and activation of glycolytic metabolism in order to cope with the energetic demand required for cellular proliferation.

Temperature gradient capillary electrophoresis (TGCE) analysis of WM35 and WM35 PKB^{DD} mixed heteroduplexes showed a high degree of mutation compared with the homoduplexes formed from unmixed samples of either cell line (Figure 6). The broad spectrum

of changes apparent from the electropherogram tracings, as well as those identified by the mutation detection software, necessitated complete sequence analysis in order to accurately characterize the nucleotide changes. For example, in amplicon 1 as shown in Figure 6 (consisting of 440 bp of noncoding D-loop sequence), sequence analysis identified 4 single nucleotide changes, all of which were transitions, between WM35 and WM35 PKB^{DD} cell lines. Complete sequence analysis of the entire mitochondrial DNA (mtDNA) of WM35 and WM35 PKB^{DD} identified 85 total single nucleotide changes that affected a total of 66 codons (Table 1). These nucleotide changes resulted in a total of 50 amino acid changes between WM35 and WM35 PKB^{DD} cells. These mutations were not randomly distributed throughout the mitochondrial

**Figure 6**

Amplicon 1 TGCE electropherogram tracings for WM35 cells, WM35 PKB cells, and the mixed sample. Amplicon 1 (spanning mitochondrial positions 16278–148) is a 440-bp fragment that was one of 3 from the 17 total amplicons not subjected to restriction endonuclease treatment, yielding a single peak upon TGCE analysis, as shown for both the WM35 and the WM35 PKB homoduplexes. The mixed sample, however, consisted of a characteristic double peak, suggestive of nucleotide differences between the 2 samples that led to the formation of both homoduplex and heteroduplex species that were resolved from one another in this assay.

**Table 1**

Summary of nucleotide differences between WM35 and WM35 PKB cells

	<i>MT-DLOOP</i>	<i>MT-ND1</i>	<i>MT-ND2</i>	<i>MT-CO1</i>	<i>MT-CO2</i>	<i>MT-ATP6</i>	<i>MT-ND4</i>	<i>MT-TS2</i>	<i>MT-ND5</i>	<i>MT-ND6</i>	<i>MT-CYB</i>	Total
Nucleotide positions	16024– 576	3307– 4262	4470– 5511	5904– 7445	7586– 8269	8527– 9207	10760– 12137	12207– 12265	12337– 14148	14149– 14673	14747– 15887	
Nucleotide changes	9	7	28	1	13	1	1	1	20	1	3	85
Transitions	9	3	16	1	3	1	1	0	5	0	3	42
Transversions	0	4	12	0	10	0	0	1	15	1	0	43
Synonymous changes	–	2	7	0	3	0	1	–	2	0	1	16
Nonsynonymous changes	–	5	21	1	10	1	0	–	18	1	2	59
Amino acid changes	–	5	17	1	9	1	0	–	15	1	1	50

A total of 66 codons were impacted. “–” denotes no possible amino acid change because the gene does not encode a protein.

genome, but rather largely clustered, especially within complex I coding genes. Complex I genes were the targets of 57 of the 85 total nucleotide changes and 38 of the 50 total amino acid substitutions. Complex IV also experienced a high mutation rate, with 13 nucleotide changes and 9 amino acid substitutions occurring within cytochrome oxidase II (COII). Complete characterizations of the nucleotide differences between WM35 and WM35 PKB^{DD} cells are provided in Table 2 and Supplemental Table 1 (available online with this article; doi:10.1172/JCI30102DS1).

We had not expected to identify such a high number of nucleotide changes, particularly nonsynonymous changes, between the 2 lineages differing only in the active expression of Akt. Therefore, it was desirable to further characterize these amino acid substitutions and determine their position within the overall 3-dimensional structure and their incorporation into specific protein domains or motifs (Table 2). Of the 50 nonsynonymous nucleotide changes, 19 involved amino acids that exhibit a low level of evolutionary conservation, and 11 of the 19 also reside in transmembrane domains and/or low-complexity protein sequence regions. These residues are not likely to be critical to the catalytic functioning of their respective mtDNA genes. An additional 13 amino acid substitutions were at positions that are generally conserved in mammals (and minimally in both mice and humans); 9 of these were in transmembrane domains and/or low-complexity sequence regions, again suggesting that the amino acid is subject to alteration with minimal functional defect. Finally, 18 amino acid changes occurred in extremely highly conserved positions, although a large proportion of them reside in transmembrane domains and/or low-complexity sequence regions (35). It is interesting to note that 11 amino acids were completely conserved among all species examined (indicating that they may be important to the protein's structure and/or function), but they were altered between WM35 and WM35 PKB^{DD}. All of these occurred within complex I genes, with 8 in NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) and 3 in ND5. These results indicate that the active expression of Akt within melanoma cells may lead to critical mutations within mitochondrially encoded complex I genes that affect the overall bioenergetic function of the organelle.

In order to determine whether mtDNA mutation is a frequent event in melanoma, we analyzed mtDNA from samples of 13 normal melanocytes, 7 melanomas, and 16 melanoma cell lines. In addition, we transfected the PKB^{DD} construct into WM35 cells, selected them, and injected them into mice after minimal time in tissue culture. We did not observe a significant amount of mtDNA mutation in any of these samples, suggesting that Akt can trans-

form radial growth melanoma cells in the presence or absence of extensive mtDNA mutation. Consistent with these findings from human specimens, when radial growth WM35 cells were transfected with the same Akt construct as in our initial study, extensive mtDNA mutations were not observed (data not shown). NOX4 was induced by Akt transfection, but induction of ROS in vitro was not observed (data not shown). A model accounting for both events is shown in Figure 7.

Discussion

Melanoma is a common cancer that in its advanced stages is resistant to most forms of chemotherapy and radiation. Melanoma progresses from an early, surgically curable stage, known as radial growth melanoma, to the invasive vertical growth melanoma. The precise biochemical changes that accompany this transition are not fully understood, but several genes have been shown to be upregulated or downregulated during this transition. Markers of angiogenesis, such as VEGF and matrix metalloproteinases, are upregulated in vertical growth melanoma, and the small G protein rho C is associated with metastatic growth of melanoma (29, 36). Integrins such as $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ are seen more commonly in advanced melanoma and may function in part by activating PI3K signaling in the tumor cells in response to extracellular matrix and tumor stromal cells (36, 37). NF- κ B signaling is elevated in aggressive melanoma cells (38), while AP-1 subunits undergo changes in composition from c-jun/ATF2, predominating in early melanoma, to JunD in vertical growth melanoma (31, 39). Interestingly, high levels of activated (i.e., phosphorylated) JunD were observed in triplicate tumor-derived specimens in the present study, suggesting that JunD may be a direct target of Akt activation (31, 39). Normal cells respond to ROS stress by inducing p53 activity. In tumor cells that use ROS signaling, p53 activation must be diminished to allow further cell replication. One potential mechanism is through Sirt1 activation, which causes deacetylation and inactivation of p53 (40, 41). We demonstrated that Sirt1 mRNA was present in A375 human melanoma cells and was downregulated through specific Akt inhibition, implicating Sirt1 as a downstream target of Akt. However, the precise mechanism converting the radial growth phenotype to the vertical growth phenotype is unknown.

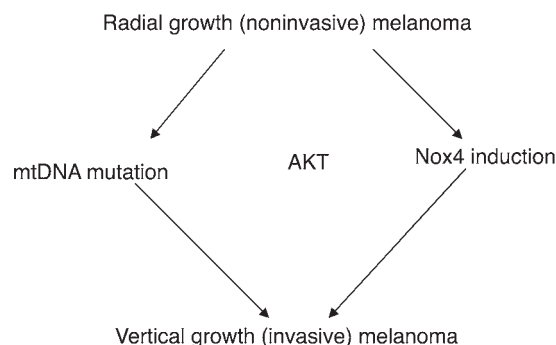
Otto Warburg first observed that tumor cells exhibit a predominantly glycolytic phenotype (42), and Akt has recently been shown to be capable of causing the switch to the glycolytic phenotype (43). We recently developed a bioenergetic index to quantify the switch to glycolytic metabolism in tumor biopsies and in archival, paraffinized sections of human tumors that illustrates the



Table 2
Nucleotide differences between WM35 and WM35 PKB cells

Position	Mito	WM35	WM35 PKB	aa change	Ti/ tv ^A	Seq. region	aa pos.	Protein reg. ^B	Deg. conserv. ^C	Position	Mito	WM35	WM35 PKB	aa change	Ti/ tv ^A	Seq. region	aa pos.	Protein reg. ^B	Deg. conserv. ^C
55	T	T	C	NA	Ti	MT-DLOOP				7794	C	C	G	A→G	Tv	MT-CO2	70	LC, TM	Hi
57	T	T	C	NA	Ti	MT-DLOOP				7796	A	A	G	I→V	Ti	MT-CO2	71	LC, TM	Lo
152	T	C	T ^D	NA	Ti	MT-DLOOP				7806	T	T	G	V→G	Tv	MT-CO2	74	LC, TM	Lo
228	G	G	A	NA	Ti	MT-DLOOP				7809	T	T	G	L→R	Tv	MT-CO2	75	LC, TM	Lo
310	T	T	C	NA	Ti	MT-DLOOP				7813	C	C	G	I→M	Tv	MT-CO2	76	LC, TM	Hi
3476	C	C	T	T→I	Ti	MT-ND1	57		Lo	7822	A	A	G	NC	Ti	MT-CO2	79		
3497–8	C, C	C, C	G, G	A→G	Tv	MT-ND1	64		Lo	7825	C	C	G	NC	Tv	MT-CO2	80		Lo
3507	C	C	T	NC	Ti	MT-ND1	67			7845–6	C, A ^F	A, A	C ^D , G	K→T	Ti, Tv	MT-CO2	87		Hi
3508	A	A	T	I→F	Tv	MT-ND1	68	LC	Lo	7913	T	T	G	Y→D	Tv	MT-CO2	110		Hi
3514	C	C	T	L→F	Ti	MT-ND1	70	LC	Int	8092	C	C	G	NC	Tv	MT-CO2	169		Lo
3527	C	C	G	A→G	Tv	MT-ND1	74	LC	Int	9064	G	G	A	A→T	Ti	MT-ATP6	180	TM	
4697	C	C	T	NC	Ti	MT-ND2	76			11410	T	T	C	NC	Ti	MT-ND4	217		
4769	A/G	A	G	NC	Ti	MT-ND2	100			12262	C	G	C ^D	NA	Tv	MT-TS2	NA		
5157	C	T	C ^D	NC	Ti	MT-ND2	230			12368	C	C	A	T→N	Tv	MT-ND5	11	LC	V.lo
5178–9	C, T	A, G	C, T ^D	Stop→L	Tv	MT-ND2	237	LC	Int	12388	C	C	G	P→A	Tv	MT-ND5	18	LC	Comp
5208	A	C	A ^D	P→T	Tv	MT-ND2	247	LC, TM	Lo	12415, 12417	A, C	T, G	A, C ^D	Stop→N	Tv	MT-ND5	27		V.lo
5214	C	T	C ^D	F→L	Ti	MT-ND2	249	LC, TM	Comp	12443	T	T	G	V→G	Tv	MT-ND5	36	TM	V.lo
5221	T	C	T ^D	P→L	Ti	MT-ND2	251	LC, TM	Comp	12455–6	T, C	T, C	G, A	V→G	Tv	MT-ND5	40	TM	Lo
5230	T	C	T ^D	P→L	Ti	MT-ND2	254	LC, TM	Comp	12469	A	T	A ^D	F→I	Tv	MT-ND5	45	TM	Int
5239	T	G	T ^D	R→L	Tv	MT-ND2	257	LC, TM	Int	12496	T	G	T ^D	V→F	Tv	MT-ND5	54	TM	Comp
5244	G	C	G ^D	R→G	Tv	MT-ND2	259	LC, TM	Comp	12538	T	T	G	W→G	Tv	MT-ND5	68		Int
5259	T	A	T ^D	Stop→W	Tv	MT-ND2	264			12546	A	G	A ^D	NC	Ti	MT-ND5	70		Lo
5263	C	G	C ^D	G→A	Tv	MT-ND2	265		Lo	12568–9	C, T	C, T	G, A	L→E	Tv	MT-ND5	78		Lo
5265–6	A, T	C, C	A, T ^D	P→I	Ti, Tv	MT-ND2	266		Int	12580	C	C	G	L→V	Tv	MT-ND5	82		Lo
5273	A	G	A ^D	NC	Ti	MT-ND2	268		Lo	12610	G	A	G ^D	M→V	Ti	MT-ND5	92	TM	Int
5291	T	G	T ^D	K→N	Tv	MT-ND2	274		Comp	12661	A	A	G	N→D	Ti	MT-ND5	109		Lo
5292	A	C	A ^D	R→S	Tv	MT-ND2	275		Int	12710	T	A	T ^D	Q→L	Tv	MT-ND5	125	TM	Int
5297	C	T	C ^D	NC	Ti	MT-ND2	276			12718	A	A	G	M→V	Ti	MT-ND5	128	TM	Comp
5298	A ^E	C	C	L→F	Ti	MT-ND2	277	TM	Int	12780	A	A	G	NC	Ti	MT-ND5	148		
5307	A	C	A ^D	P→T	Tv	MT-ND2	280	TM	Comp	12827	C	G	C ^D	G→A	Tv	MT-ND5	164	TM	Int
5310–1	A, T	A, T	C, C	I→P	Ti, Tv	MT-ND2	281	TM	Lo	14217	C	C	G	V→L	Tv	MT-ND6	153		Lo
5325	A ^F	C	T	NC	Ti	MT-ND2	286	TM	Int	14953	C	C	T	NC	Ti	MT-CYB	69		
5331–2	C, T	C, T	T, C	L→S	Ti	MT-ND2	288	TM	Comp	15485–6	C, C	C, C	T, T	P→L	Ti	MT-CYB	247	TM	Hi
5338	T	T	C	L→P	Ti	MT-ND2	290	TM		16129	G	G	A	NA	Ti	MT-DLOOP			
5348	C	T	C ^D	NC	Ti	MT-ND2	293	TM	Hi	16193	C	T	C ^D	NA	Ti	MT-DLOOP			
6253	T	T	C	M→T	Ti	MT-CO1	117	TM	Hi	16293	A	G	A ^D	NA	Ti	MT-DLOOP			
7786	C	C	G	I→M	Tv	MT-CO2	67	LC, TM	Hi	16519	T	C	T ^D	NA	Ti	MT-DLOOP			
7787	C	C	G	L→V	Tv	MT-CO2	68	LC, TM	Hi										

Unless otherwise noted, WM35 nucleotide is identical to the corresponding Cambridge mitochondrial consensus sequence (Mito); rare polymorphisms are excluded. ^ATi, transition; Tv, transversion. ^BDenotes whether mutation occurs in a transmembrane domain (TM) or low complexity (LC) region of the gene product. ^CDegree of cross-species conservation: V.lo, very low; Lo, low; Int, intermediate; Hi, high; Comp, complete. ^DChange from WM35 represents a reversion to the Revised Cambridge mitochondrial consensus sequence. ^ENucleotide codes for isoleucine.

**Figure 7**

Schematic of the 2 mechanisms by which Akt may transform cells. Akt may prevent cells that already have mtDNA mutations from undergoing apoptosis or senescence due to ROS. Akt may also induce NOX4, which may increase the cells' ability to generate ROS in vivo. Both mechanisms of ROS, in the presence of Akt, may lead to NF- κ B activation and resistance to apoptosis.

glycolytic phenotype of lung, colon, kidney, breast, esophageal, and gastric cancers (44–46). The switch to the glycolytic phenotype has been correlated with poor clinical outcome in human solid tumors of the colon and lung (45, 46). In Akt-transduced melanoma cells, we observed a mitochondrial dysfunction with concurrent upregulation of ROS production and flux of glycolysis, a situation known to affect the cellular sensitivity to apoptosis (47). Recent findings showed that cells that undergo glycolytic metabolism have increased production of ROS, including superoxide and hydrogen peroxide (48). ROS can be generated through activation of the cytochrome b558 complex, which is activated by membrane localization or amplification of NOX family genes (49, 50). Introduction of Akt into radial growth melanoma cells resulted in a marked increase in intracellular ROS. We found that Akt can increase ROS through 2 mechanisms: induction of the ROS-generating enzyme NOX4 and mtDNA mutation (Figure 7). One possibility is that sustained generation of low levels of ROS may cause mtDNA mutations in addition to genomic instability (50) and that the presence of Akt stabilizes cells that develop mtDNA mutations. Cells with induction of NOX4 did not show the same level of mtDNA mutation as did cells lacking NOX4 induction. The generation of ROS in respiration-deficient cells likely occurs at complex I (51, 52). As we have demonstrated herein, complex I activity and the mitochondrial encoded genes of this protein complex were the likely targets that impaired the normal bioenergetic function of mitochondria in Akt-transduced cells, therefore promoting their expected metabolic switch to glycolysis as the preferred energy pathway.

Previous studies have shown that neoplastic behavior in cells is associated with changes in mtDNA (50). In order to determine whether mtDNA mutations represent a necessary process in the alteration of the neoplastic phenotype, we generated new cell lines by transfecting in the pKBDD vector expressing Akt and selecting for new clones resistant to puromycin. The new clones were tested for their ability to form invasive tumors in nude mice and, indeed, they displayed the same behavioral alterations of vertical growth and the formation of large tumors as did the parental cell line WM35. We performed phenotypic studies and genotype analysis on these new clones at a low passage number. We also sought to

minimize the time the clones were cultured after transformation with pKB. The ND1 and ND5 genes within the mtDNA, which were shown in our initial study to represent mutational hot spots, were amplified by PCR and sequenced.

In strong contrast to the initial studies that were carried out in cells extensively cultured after Akt transfection, the low-passage cell lines and primary clinical samples contained no acquired mtDNA changes in ND1 or ND5. Our interpretation of this finding is that the mtDNA mutations are not sufficient to support the alteration in growth seen in WM35 cells overexpressing Akt. The accrual of mtDNA mutations in the high-passage cell lines was the likely result of prolonged Akt expression, which led to increased production of ROS. This ROS imparted damage to the mtDNA in a nonrandom distribution, which likely further subjected the high-passage cells to increased oxidative stress. We conclude that although the mtDNA mutations did occur nonrandomly in the mtDNA of high-passage WM35 PKB cells, the presence of these mutations (in at least 2 of the complex I genes) was not essential for the aggressive growth phenotype, but rather was a reflection of prolonged exposure to increased oxidative stress that accumulates with prolonged Akt overexpression. Of interest, high levels of ROS were not observed in melanoma cells in which Akt had induced NOX4 in vitro. A possible reason for this observation is that in vivo growth may be necessary for maximal induction of ROS by NOX4; notably, NOX4 alone failed to transform immortalized cells in previous studies (53), implying the existence of additional factors.

The survival advantage conferred to a tumor cell by a glycolytic metabolism is not fully understood, especially since ATP generation is markedly inefficient compared with respiration. We propose that glycolytic metabolism provides a survival mechanism for tumor cells through the activation of ROS–NF- κ B signaling and the prevention of apoptosis. In primary cells, ROS causes cell senescence and apoptosis. This senescence is caused in part by induction of p16^{ink4a}, and hypermethylation of p16^{ink4a} occurs commonly in tumors induced by oxidative stress (54, 55). Further events are required to prevent apoptosis caused by ROS, such as inactivation of caspase-9/apoptotic protease-activating factor (caspase-9/Apaf) signaling, and genes in this cascade can be inactivated either functionally or epigenetically (56, 57). Caspase-9/Apaf-1-mediated apoptosis requires ATP, and decreased production of ATP as a result of glycolytic metabolism may by itself provide a survival advantage in cells that generate high levels of superoxide. Apaf-1 is hypermethylated in advanced melanoma, and caspase-9 is inactivated by Akt phosphorylation (56–58). In addition, recent findings indicate that Akt is required to inhibit apoptosis by mediating the maintenance of the glycolytic hexokinase bound to the mitochondria, thus preventing the release of cytochrome c and the execution of apoptosis (3, 59). Therefore, tumor cells (such as those found in melanoma) have defenses against senescence and apoptosis and can use ROS and a glycolytic phenotype as signaling mechanism and cell-defense devices. Recently, coexpression of hypoxia-inducible factor 1 and Akt in murine melanocytes was found to cause transformation to melanoma that was highly sensitive to rapamycin (60). Unfortunately, rapamycin analogs were not found to be active against melanoma in a human clinical trial (61). Thus, Akt likely uses other signaling pathways in human melanoma. One potential mechanism of rapamycin resistance in melanoma is through the involvement of rictor, a component of the mTOR complex that is relatively resistant to rapamycin compared with the raptor complex. A375, a highly tumorigenic spontaneous



melanoma cell line, expresses high levels of rictor mRNA. Treatment with an Akt inhibitor resulted in reduction of rictor levels, suggesting that melanoma may be rapamycin resistant, at least in part, because of high rictor expression. High expression of Sirt1 and rictor (62) may be adaptations that tumor cells make in order to survive high ROS expression, and Akt may be the immediate regulator of these proteins. We demonstrated that Akt induced ROS in human melanoma and was likely a major mechanism of Akt-induced oncogenesis in human melanoma. Manipulations that result in increased respiration, either through inhibition of Akt or by inducing synthesis of respiratory enzymes, may have therapeutic benefit in melanoma treatment.

Methods

Cell lines and protein extraction

WM35 radial growth phase melanoma cells were transfected with 40 µg of the plasmid pBABE puro or pBABE PKB^{DD}, which encodes and expresses active Akt in the presence of 40 µl Superfect transfection reagent (Qiagen) in 2 ml complete serumless media (Cellgro; Mediatech Inc.). Both vectors encode puromycin resistance, and cells were selected in 2 µg/ml puromycin and pooled to avoid clonal variation. Expression of the gene was confirmed by Western blot analysis with an antibody specific to phosphorylated Akt. A stable clone of WM35 overexpressing Akt, WM35 PKB^{DD}, was also studied. Cells were grown in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with a mixture containing 400 µM each of the amino acids (63) alanine, asparagine, aspartic acid, glutamic acid, and proline (Merck) as well as 1 mM glutamine (EMD) plus 10% FCS (Biological Industries) and 0.6% penicillin and 1% streptomycin (Sigma-Aldrich) in 7% CO₂ atmosphere (64). Cells were recovered from the plates by trypsin treatment and washed twice with PBS. The recovered cells were lysed in a buffer containing 5 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% Triton X-100, 20 mM EDTA, 1 µg/ml pepstatin, and 1 µg/ml leupeptin at 4°C for 10 minutes. After protein extraction, the samples were centrifuged (15,000 g) at 4°C for 5 minutes. The proteins from tumor tissues were obtained by homogenizing the tissue sample in the lysis buffer described above and centrifuging at 2,000 g for 10 minutes at 4°C. The supernatant-containing protein lysate was removed from the tube and used for Western blot analysis. The protein concentration in the supernatants was determined with the Bradford reagent (Bio-Rad Protein Assay) using BSA as standard. Aliquots of the supernatants were stored at -80°C until used. Complex I activity determination was performed as previously described (65). Primary cells from the Cardinal Bernardin Cancer Center at Loyola University were maintained as previously described (66). The A375 human melanoma cell line, obtained from the ATCC, was grown in DMEM with 4 mM L-glutamine adjusted to contain 90% 1.5 g/l sodium bicarbonate and 4.5 g/l glucose and 10% fetal bovine serum at 37°C.

Western blotting

Cellular proteins (10 or 15 µg protein) were fractionated on 10% SDS-PAGE and then transferred onto PVDF membranes (Millipore). Western blotting of the membranes was performed essentially as described previously (29) using the appropriate dilution of various antisera. The antibodies used in this study included anti-β-F₁-ATPase (diluted 1:20,000; ref. 46), monoclonal anti-Hsp60 (diluted 1:2,000; SPA 807; Stressgene), polyclonal antibody to JunD (diluted 1:1,000; ab5799; Abcam), polyclonal antibody to phosphorylated JunD (phospho-S255, diluted 1:1,000; ab30631; Abcam), antibody to phosphorylated Akt (phospho-AktS473, diluted 1:1,000; 4058; Cell signaling), monoclonal anti-α-tubulin (diluted 1:2,000; Sigma-Aldrich), and monoclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (diluted 1:10,000; Abcam). Secondary horseradish peroxidase-conju-

gated goat anti-rabbit or anti-mouse antibody (diluted 1:3,000) was used for detection, which was accomplished using an enhanced chemiluminescence detection method (Amersham Biosciences). Quantification of immunoreactive band intensity (in AU) was accomplished using a Kodak DC120 Zoom digital camera and the Quantity One software package (version 4.3.1; Bio-Rad). In order to calculate the cellular expression level of the markers, the band intensity of β-F₁-ATPase, Hsp60, and GAPDH was divided by the band intensity of α-tubulin. The β-F₁-ATPase/Hsp60 ratio and bioenergetic cellular index (calculated as β-F₁-ATPase/Hsp60/GAPDH; ref. 45) were also determined.

Quantitative RT-PCR

Primers for human VEGF were used for real-time RT-PCR as described by Arbiser et al. (28). Quantitative RT-PCR was performed to determine NOX4 levels using primers specific for human NOX4 or for 18S as follows: NOX4 forward, 5'-GTATGTTGCATAACAAGTTTGG-3'; reverse, 5'-TCAGCTGAAAGACTCTTTATTGT-3'; 18S forward, 5'-GAGTATGGTTGCAAAGCTGAAAC-3'; reverse, 5'-CCAGACAAATCGCTCCACCAAC-3'. cDNA was obtained from RNA by reverse transcription using Advantage RT for PCR according to the manufacturer's instructions (Clontech). PCR reaction was as follows: 7.3 µl cDNA, 0.1 µl 10 mM forward NOX4 or 18S primer, 0.1 µl 10 mM reverse NOX4 or 18S primer, and 7.5 µl SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The PCR reaction included an initial cycle of 95°C for 10 minutes, followed by 45 cycles of 95°C for 30 seconds, 56°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. Results are reported relative to the mean starting quantities of NOX4 normalized to 18S. The propagation of error was calculated using the following formula:

Equation 1

$$x/y \times \sqrt{(\sigma_x/x)^2 + (\sigma_y/y)^2},$$

where x represents mean NOX4, y represents mean 18S, and σ represents standard deviation. Quantitative PCR for VEGF, Sirt1, and rictor was performed using Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems). For the reaction, 96-well Optical Reaction Plate (ABI PRISM, no. 128; Applied Biosystems) was used. A measure of 2.5 l of template diluted 1:10 in cross-linked water was used in each well, and the experiment was performed in triplicate. VEGF(hs00173626_m1), Sirt1(HS00202021_m1), rictor(AVO3, hs01561908_m1), and corrected for 18S (Hs99999901_s1, Taqman Gene Expression Assay; Applied Biosystems) primers were used along with crosslinked molecular-grade water (Cellgro; Mediatech Inc.) and master mix (TaqMan Fast Universal PCR Master Mix; Applied Biosystems; ref. 2). The reaction was run on the 7900 Applied Biosystems Reader for Absolute Quantification for 96-well plates. Threshold cycle (Ct) values were analyzed by the Ct method, and mean and SEM were calculated.

Determination of glycolysis

Cells were seeded and allowed to grow until reaching 60% confluence in supplemented RPMI 1640 media. In order to determine the rates of glycolysis, the cells were preincubated for 30 minutes with 6 µM oligomycin. After replacing the culture medium supplemented with the inhibitor of the mitochondrial H⁺-ATP synthase, a 0.1-ml aliquot of the media was taken after 2 hours of incubation. The collected samples were precipitated in 6% perchloric acid, neutralized, and used for the enzymatic determination of lactate as described previously (66).

Dichlorofluorescein diacetate and dihydroethidium assays

Cells were allowed to grow until reaching 80% confluency. Cells were washed once with 5 ml HBSS and digested with 0.5 ml 0.25% trypsin in 2.7 mM EDTA for 2 minutes at room temperature followed by the



addition of DMEM without phenol red. Cells were dislodged from the plate by gentle pipetting and transferred to eppendorf tubes. Cells were pelleted in a Hermle Z18M tabletop centrifuge at 300 *g* for 2 minutes. The media was gently removed from the pellet by pipetting, and cells were resuspended in 1 ml DMEM without phenol red and divided into 2 0.5-ml aliquots. In the first aliquot, 0.5 ml of 4 μ M dichlorofluorescein diacetate in DMEM (without phenol red) was added for a final dichlorofluorescein diacetate concentration of 2 μ M, and the cells were incubated in the dark on a rotating wheel at room temperature for 45 minutes. In the second aliquot, 0.5 ml of 20 μ M dihydroethidium in DMEM (without phenol red) was added for a final dihydroethidium concentration of 10 μ M, and the cells were incubated at room temperature in the dark for 30 minutes. Cells were then immediately transferred to ice and analyzed on a flow cytometer (BD Biosciences).

Superoxide dismutase assays

Cells were washed 3 times in PBS (pH 7.0) plus 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 8 mM NaHPO_4 , and 136.9 mM NaCl, scraped from the dishes, and centrifuged at 82 *g* for 5 minutes. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 50 mM PBS (pH 7.8). Cells were sonicated 3 times at 28% amplitude, 30 seconds each time on ice using a Vibra Cell Sonicator with a cup horn (Sonics and Materials Inc.). Protein concentrations were measured by the Bradford method (Bio-Rad; ref. 67) and standardized with BSA. The protein concentrations for the glutathione assay were based on the method described by Lowry (68).

Western blots were performed according to the method described by Laemmli (69). Total cellular proteins were electrophoresed in a 12.5% SDS polyacrylamide gel for MnSOD and CuZnSOD and 8% SDS polyacrylamide gel for catalase (CAT). Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Whatman Schleicher & Schuell), blocked in 5% dry milk in TTBS (0.01 M Tris, 0.15 M NaCl buffer, pH 8.0, and 0.1% Tween 20) at room temperature for 1 hour. After washing 3 times with TTBS, the membrane was incubated with primary antibody (diluted 1:1,000) in TTBS at room temperature for 1 hour for MnSOD, CuZnSOD or overnight at 4°C for CAT. After washing the membrane 3 times with TTBS, the blots were incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase diluted 1:10,000 in TTBS for 1 hour. After incubating the membrane in TTBS for 40 minutes, the washed blot was treated with chemiluminescence (ECL Plus) Western blot detection solution (Amersham Biosciences) and exposed to X-ray film (BioMaxMR; Eastman Kodak Company).

The SOD activity gel assay is based on the inhibition of the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) by SOD (70). Equal amounts of protein (100 μ g) from different samples were subjected to 12% native polyacrylamide gels by electrophoresis in nondenaturing running buffer (pH 8.3). For SOD band visualization, after electrophoresis the gel was incubated in 2.43 mM NBT, 28 μ M riboflavin-5-phosphate, 28 mM tetramethylethylenediamine, and 0.75 mM NaCN in double distilled H_2O for 20 minutes under dark conditions. The gels were illuminated under a fluorescent light until achromatic SOD bands and a satisfactory blue background appeared.

The CAT activity gel assay was carried out as previously described by Sun et al. (71). Equal amounts of protein (100 μ g) from different samples were subjected to 8% native polyacrylamide gels by electrophoresis in nondenaturing running buffer (pH 8.3). For CAT band visualization, after electrophoresis the gel was incubated in 0.003% hydrogen peroxide for 10 minutes and then staining with 2% ferric chloride and 2% potassium ferricyanide until achromatic CAT bands began to form.

Mitochondrial DNA analysis

DNA isolation and PCR amplification. Genomic DNA was isolated from melanoma cell culture specimens of WM35 and WM35 PKB^{DD} using Clontech's

NucleoSpin Tissue Kit. In addition, samples of 13 normal melanocytes, 7 melanomas, and 16 melanoma cell lines were analyzed. The entire mtDNA from both cell lines was amplified by 17 pairs of oligonucleotide primers (Sigma-Aldrich), producing 17 overlapping amplicons. PCR reactions were performed in 50- μ l volumes containing 10 ng of template DNA; 0.5 μ M of the forward and reverse oligonucleotide primers (for complete list of primer pairs, see Supplemental Table 1 of ref. 72); 0.2 mM of each dNTP (New England Biolabs Inc.); 1.5 mM MgCl_2 ; magnesium-free buffer (50 mM KCl and 10 mM Tris-HCl); and 2.5 U *Taq* DNA polymerase. Each sample was subjected to the following amplification conditions for 32 cycles: an initial denaturation at 95°C for 5 minutes, 45 seconds' denaturation at 95°C, 1 minute at the annealing temperature of 57°C, and elongation at 72°C for 2 minutes. This was followed by a 5-minute final extension at 72°C and subsequent cooling to 4°C. For analysis, 5 μ l of each sample was fractionated on a 2% agarose gel with 0.05 μ g/ml ethidium bromide. PCR products were directly visualized with UV fluorescence. Of the remaining 45 μ l of each PCR product, 22.5 μ l was prepared as described below and used for sequencing, while the other 22.5 μ l was digested and prepared for TGCE analysis.

TGCE analysis. The 17 PCR amplicons for each of the WM35 and WM35 PKB^{DD} cell lines were subjected to restriction endonuclease digestion as described previously (see Supplemental Table 1 of ref. 72). The digested products were visualized by gel electrophoresis on a 2% agarose gel with 0.05 μ g/ml ethidium bromide. The intent was to use TGCE as a screening method to detect mtDNA sequence regions that contained nucleotide differences between WM35 cells and WM35 PKB^{DD} cells. Each of the 17 digested PCR amplicons from the WM35 template was mixed with an equal quantity of the corresponding WM35 PKB^{DD} PCR amplicon. In a 10- μ l total reaction volume, the samples were initially denatured at 95°C for 3 minutes, followed by annealing via a stepwise reduction in temperature as previously described (72).

Automated TGCE analysis was carried out using the Reveal Mutation Discovery System (SpectruMedix). This system separated the restriction digests of the 17 amplicons from WM35 and WM35 PKB^{DD} cells into homoduplexes in identical sequence regions and heteroduplexes in sequence regions mutated between the 2 cell lines. The parameters for the thermal ramp, injection, capillary length, and gel formation were as recommended by the manufacturer and have been enumerated previously (72). The resulting data were analyzed by Revelation Mutation Discovery software (version 2.4; SpectruMedix).

Sequence analysis. Suspected nucleotide changes between WM35 and WM35 PKB^{DD} amplicons identified by TGCE analysis were quantified and clarified by direct sequence analysis. Equal amounts (22.5 μ l) of each of the PCR products representing the original 17 overlapping amplicons (undigested) were prepared for sequencing as follows: 0.25 μ l exonuclease I, 0.5 μ l shrimp alkaline phosphatase (SAP), and 0.25 μ l of SAP buffer were added to each of the PCR products, followed by incubation for 30 minutes at 37°C, 30 minutes at 80°C, and cooling to 4°C. The PCR products were then sequenced using an Applied Biosystems 3100 automated DNA sequencer by the chain-termination method.

Computational analyses. The 17 overlapping sequences were used in the manual creation of contigs covering over 98% of the entire mtDNA sequences for WM35 and WM35 PKB^{DD} cells. These 2 complete sequences were aligned with the Revised Cambridge Reference mitochondrial sequence (Mitomap; <http://www.mitomap.org>) using the MegAlign module of Lasergene software (version 6 for Windows; DNASTAR), with the Clustal V algorithm and the default settings, followed by manual refinement. Mitoanalyzer was used to determine the amino acid changes that accompanied corresponding nucleotide changes between WM35 and WM35 PKB^{DD}. Homologene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene>) was used to attain access to homologous eukaryotic sequences for each mitochondrial gene that was found to be affected by nonsynonymous amino acid changes.



These sequences were aligned and analyzed for evolutionary conservation via T-Coffee software (35). Finally, Pfam (version 16.0; ref. 73) domain structures were used to determine the specific domains of the protein's 3-dimensional conformation that are involved in specific amino acid changes.

Immunofluorescence

Cells on glass coverslips were rinsed quickly in ice-cold PBS, fixed in freshly prepared 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes at room temperature, permeabilized in 0.05% Triton X-100 in PBS for 5 minutes, and rinsed sequentially in PBS, 50 mmol/l NH₄Cl, and PBS for 10 minutes each. After incubation for 1 hour in blocking buffer (PBS plus 3% BSA), cells were incubated with primary antibody — goat polyclonal anti-p47phox (sc-7660; Santa Cruz Biotechnology Inc.), rabbit polyclonal anti-p47phox (sc14015; Santa Cruz Biotechnology Inc.), mouse monoclonal anti-p47phox (610354; BD Biosciences), rabbit polyclonal anti-p47phox R360, or mouse monoclonal anti-p47phox 43.12 (both kind gifts of M. Quinn, Montana State University, Bozeman, Montana, USA) — for 1 hour at room temperature, rinsed in PBS/BSA, and then incubated in either FITC-conjugated goat anti-rabbit or goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) for 1 hour at room temperature. Cells on coverslips were mounted onto glass slides in Vectashield (Vector Laboratories) and examined using the 488-nm line of the argon ion laser with a 515/30 nm band pass filter in the confocal laser scanning imaging system (MRC-1024; Bio-Rad) or using a Zeiss Axioskop microscope equipped with fluorescence optics and an AxioCam CCD camera.

In vivo growth

Control and activated Akt-expressing WM35 cells (1×10^6 cells per group) were injected subcutaneously into 5- to 6-week-old male nude mice. Tumor volume was calculated as $0.52(w^2 \times l)$, where w represents the shortest

dimension. In addition, pBabe PKB or control pBabe puro was transiently transfected using lipofectamine into WM35 to derive cells that had not been extensively cultured after PKB overexpression. Both vectors encode puromycin resistance, and cells were selected in 2 μ g/ml puromycin and pooled 72 hours after transfection. Subsequently, 6×10^5 transfected cells were pooled and then injected subcutaneously in the presence of 0.3 ml Matrigel/mouse, as well as an equivalent number of vector control cells.

Statistics

All experiments were performed in triplicate. Statistical analyses were performed by 2-tailed Student's t test for nonpaired samples. A P value less than 0.05 was considered statistically significant.

Acknowledgments

J.L. Arbiser was supported by a Veterans Administration Merit Award, NIH grant R01 AR02030, and grants from the Jamie Rabinowitch-Davis Foundation and the Minsk Foundation. B. Nickoloff was supported by NIH grants CA59327 and CA27502. J.M. Cuezva was supported by grant BMC2001-0710 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain. B. Govindarajan was supported by a Dermatology Foundation Career Development Award.

Received for publication August 17, 2006, and accepted in revised form December 12, 2006.

Address correspondence to: Jack L. Arbiser, Department of Dermatology, Emory University School of Medicine, WMB 5309, 1639 Pierce Drive, Atlanta, Georgia 30322, USA. Phone: (404) 727-5063; Fax: (404) 727-0923; E-mail: jarbise@emory.edu.

- Cohen, C., et al. 2002. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin. Cancer Res.* **8**:3728–3733.
- Govindarajan, B., et al. 2003. Malignant transformation of melanocytes to melanoma by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) signaling. *J. Biol. Chem.* **278**:9790–9795.
- Majewski, N., et al. 2004. Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol. Cell.* **16**:819–830.
- Rathmell, J.C., et al. 2003. Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol. Cell. Biol.* **23**:7315–7328.
- Peli, J., et al. 1999. Oncogenic Ras inhibits Fas ligand-mediated apoptosis by downregulating the expression of Fas. *EMBO J.* **18**:1824–1831.
- Plas, D.R., and Thompson, C.B. 2003. Akt activation promotes degradation of tuberlin and FOXO3a via the proteasome. *J. Biol. Chem.* **278**:12361–12366.
- Arbiser, J., et al. 2006. Solenopsis, the alkaloidal component of the fire ant (Solenopsis invicta), is a naturally occurring inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase signaling and angiogenesis. *Blood*. **109**:560–565.
- Dai, D.L., Martinka, M., and Li, G. 2005. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J. Clin. Oncol.* **23**:1473–1482.
- Edlundh-Rose, E., et al. 2006. NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res.* **16**:471–478.
- Landi, M.T., et al. 2006. MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma. *Science*. **313**:521–522.
- Curtin, J.A., et al. 2005. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N. Engl. J. Med.* **353**:2135–2147.
- Pollock, P.M., and Meltzer, P.S. 2002. A genome-based strategy uncovers frequent BRAF mutations in melanoma. *Cancer Cell.* **2**:5–7.
- Tsao, H., Goel, V., Wu, H., Yang, G., and Haluska, F.G. 2004. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **122**:337–341.
- Haluska, F.G., et al. 2006. Genetic alterations in signaling pathways in melanoma. *Clin. Cancer Res.* **12**(Suppl.):2301s–2307s.
- Liu, Z.J., et al. 2006. Notch1 signaling promotes primary melanoma progression by activating mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathways and up-regulating N-cadherin expression. *Cancer Res.* **66**:4182–4190.
- Stahl, J.M., et al. 2004. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* **64**:7002–7010.
- Meyskens, F.L., Jr., Buckmeier, J.A., McNulty, S.E., and Tohidian, N.B. 1999. Activation of nuclear factor-kappa B in human metastatic melanoma cells and the effect of oxidative stress. *Clin. Cancer Res.* **5**:1197–1202.
- Szatrowski, T.P., and Nathan, C.F. 1991. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* **51**:794–798.
- Irani, K., et al. 1997. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science*. **275**:1649–1652.
- Finkel, T. 2000. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* **476**:52–54.
- Archer, H., and Bar-Sagi, D. 2002. Ras and Rac as activators of reactive oxygen species (ROS). *Methods Mol. Biol.* **189**:67–73.
- Nagata, Y., et al. 2004. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell.* **6**:117–127.
- Hu, M.C.T., et al. 2004. I kappa B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell.* **117**:225–237.
- Yang, J.Q., et al. 2001. V-Ha-Ras overexpression induces superoxide production and alters levels of primary antioxidant enzymes. *Antioxid. Redox. Signal.* **3**:697–709.
- Yang, J.Q., et al. 2002. v-Ha-ras mitogenic signaling through superoxide and derived reactive oxygen species. *Mol. Carcinog.* **33**:206–218.
- Suh, Y.A., et al. 1999. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. **401**:79–82.
- Arnold, R.S., et al. 2001. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:5550–5555.
- Arbiser, J.L., et al. 2002. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:715–720.
- Chudnovsky, Y., Adams, A.E., Robbins, P.B., Lin, Q., and Khavari, P.A. 2005. Use of human tissue to assess the oncogenic activity of melanoma-associated mutations. *Nat. Genet.* **37**:745–749.
- Yang, S., McNulty, S., and Meyskens, F.L., Jr. 2004. During human melanoma progression AP-1 binding pairs are altered with loss of c-Jun in vitro. *Pigment Cell Res.* **17**:74–83.
- Ronai, Z., et al. 1998. ATF2 confers radiation resistance to human melanoma cells. *Oncogene*. **16**:523–531.
- Esposito, L.A., Melov, S., Panov, A., Cottrell, B.A., and Wallace, D.C. 1999. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:4820–4825.
- Brown, M.D., et al. 2001. Novel mtDNA mutations and oxidative phosphorylation dysfunction in Russian LHON families. *Hum. Genet.* **109**:33–39.



34. Sherer, T.B., et al. 2002. An in vitro model of Parkinson's disease: Linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J. Neurosci.* **22**:7006–7015.
35. Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J. 2000. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* **302**:205–217.
36. Hsu, M.Y., et al. 1998. Adenoviral gene transfer of beta3 integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma. *Am. J. Pathol.* **153**:1435–1442.
37. Dhawan, P., Singh, A.B., Ellis, D.L., and Richmond, A. 2002. Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappa B and tumor progression. *Cancer Res.* **62**:7335–7342.
38. Bhoumik, A., et al. 2002. An ATF2-derived peptide sensitizes melanomas to apoptosis and inhibits their growth and metastasis. *J. Clin. Invest.* **110**:643–650. doi:10.1172/JCI200216081.
39. Datta, R., et al. 1992. Involvement of reactive oxygen intermediates in the induction of c-jun gene transcription by ionizing radiation. *Biochemistry.* **31**:8300–8306.
40. Luo, J., et al. 2001. Negative control of p53 by Sir-2alpha promotes cell survival under stress. *Cell.* **107**:137–148.
41. Vaziri, H., et al. 2001. hSIRT1(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell.* **107**:149–159.
42. Warburg, O., Geissler, A.W., and Lorenz, S. 1970. Genesis of cancer metabolism through vitamin B1 deficiency (thiamine deficiency) [In German]. *Z. Naturforsch. B.* **25**:332–333.
43. Elstrom, R.L., et al. 2004. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* **64**:3892–3899.
44. Cuezva, J.M., et al. 1997. Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**:365–377.
45. Cuezva, J.M., et al. 2002. The bioenergetic signature of cancer: A marker of tumor progression. *Cancer Res.* **62**:6674–6681.
46. Cuezva, J.M., et al. 2004. The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis.* **25**:1157–1163.
47. Jeong, D.W., Kim, T.S., Cho, I.T., and Kim, I.Y. 2004. Modification of glycolysis affects cell sensitivity to apoptosis induced by oxidative stress and mediated by mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**:984–991.
48. Lambeth, J.D., Cheng, G., Arnold, R.S., and Edens, W.A. 2000. Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem. Sci.* **25**:459–461.
49. Brar, S.S., et al. 2002. An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**:C1212–C1224.
50. Petros, J.A., et al. 2005. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:719–724.
51. Betarbet, R., et al. 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* **3**:1301–1306.
52. Bijur, G.N., and Jope, R.S. 2003. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J. Neurochem.* **87**:1427–1435.
53. Geiszt, M., Kopp, J.B., Varnai, P., and Leto, T.L. 2000. Identification of Renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:8010–8014.
54. Govindarajan, B., et al. 2002. Reactive oxygen-induced carcinogenesis causes hypermethylation of p16(Ink4a) and activation of MAP kinase. *Mol. Med.* **8**:1–8.
55. Ito, K., et al. 2004. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature.* **431**:997–1002.
56. Soengas, M.S., et al. 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature.* **409**:207–211.
57. Cardone, M.H., et al. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science.* **282**:1318–1321.
58. Hersey, P., and Zhang, X.D. 2001. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat. Rev. Cancer.* **1**:142–150.
59. Majewski, N., Nogueira, V., Robey, R.B., and Hay, N. 2004. Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Mol. Cell. Biol.* **24**:730–740.
60. Bedogni, B., et al. 2005. The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell.* **8**:443–454.
61. Margolin, K., et al. 2005. CCI-779 in metastatic melanoma - A phase II trial of the California Cancer Consortium. *Cancer.* **104**:1045–1048.
62. Sarbassov, D.D., et al. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* **14**:1296–1302.
63. Liang, J., et al. 2002. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat. Med.* **8**:1153–1160.
64. Niers, L., van den Heuvel, L., Trijbels, F., Sengers, R., and Smeitink, J. 2003. Prerequisites and strategies for prenatal diagnosis of respiratory chain deficiency in chorionic villi. *J. Inherit. Metab. Dis.* **26**:647–658.
65. Qin, J.Z., et al. 2005. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res.* **65**:6282–6293.
66. Cuezva, J.M., Burkett, E.S., Kerr, D.S., Rodman, H.M., and Patel, M.S. 1982. The newborn of diabetic rat. 1. Hormonal and metabolic changes in the postnatal period. *Pediatr. Res.* **16**:632–637.
67. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254.
68. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265–275.
69. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680–685.
70. Beauchamp, C., and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**:276–287.
71. Sun, Y., Elwell, J.H., and Oberley, L.W. 1988. A simultaneous visualization of the antioxidant enzymes glutathione-peroxidase and catalase on polyacrylamide gels. *Free Radic. Res. Commun.* **5**:67–75.
72. Giraldo-Rosa, W., Vieugels, R.A., Musiek, A.C., Sligh, J.E. 2005. High-throughput mitochondrial genome screening method for nonmelanoma skin cancer using multiplexed temperature gradient capillary electrophoresis. *Clin. Chem.* **51**:305–311.
73. Finn, R.D., et al. 2006. Pfam: clans, web tools and services. *Nucl. Acids Res.* **34**(Database issue):D247–D251. doi:10.1093/nar/gkj149.

